# Translation

# PATENT COOPERATION TREATY

# **PCT**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P11655 Dr.B/La	FOR FURTHER ACTIO		ication of Transmittal of International Examination Report (Form PCT/IPEA/416)		
International application No.	International filing date (day	/month/year)	Priority date (day/month/year)		
PCT/EP99/07094	22 September 1999	(22.09.99)	25 September 1998 (25.09.98)		
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 39/395, 35/14, C07K 16/42, 16/28, 16/30					
Applicant	LINDHOFER,	Horst			
This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.      This REPORT consists of a total of6 sheets, including this cover sheet.					
been amended and are the backer (see Rule 70.16 and Section		ts containing retructions under	tion, claims and/or drawings which have ectifications made before this Authority the PCT).		
3. This report contains indications relat	ing to the following items:	-			
I Basis of the report					
II Priority					
III Non-establishment	of opinion with regard to no	elty, inventive	step and industrial applicability		
IV Lack of unity of in	vention				
V Reasoned statemen	at under Article 35(2) with reg nations supporting such state	gard to novelty,	inventive step or industrial applicability;		
VI Certain documents	cited				
VII Certain defects in t	he international application		<u>_</u>		
VIII Certain observation	s on the international applica	tion			
Date of submission of the demand	Date	of completion	of this report		
18 April 2000 (18.04.	00)	07	July 2000 (07.07.2000)		
Name and mailing address of the IPEA/EP	Auth	orized officer			
Facsimile No.	Tele	ohone No.			

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

# PCT/EP99/07094

I. Basis	of the	report			
					s which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):
		the international	application as	originally filed.	
	$\boxtimes$	the description,	pages	1-30	_, as originally filed,
			pages	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	_, filed with the demand,
			pages		_, filed with the letter of,
			pages		_, filed with the letter of
	$\boxtimes$	the claims,	Nos.	1-23	_ , as originally filed,
	لاعا		Nos.		, as amended under Article 19,
			Nos.	·	_, filed with the demand,
			Nos		, filed with the letter of,
			Nos	· • · •	, filed with the letter of
	$\boxtimes$	the drawings,	sheets/fig	1/6-6/6	_ , as originally filed,
	_		sheets/fig		_, filed with the demand,
			sheets/fig		, filed with the letter of,
			sheets/fig		, filed with the letter of
2. The a	mend	ments have result	ed in the cancel	lation of:	
		the description,	pages		•
		the claims,	Nos.		
		the drawings,			
3.					nendments had not been made, since they have been considered be Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
			1		
4. Addit	ional	observations, if ne	ecessary:		
					-
					· -
					į

THE TACE BLANK (USPTO)

International application No.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

PCT/EP99/07094

II. Non-establishmen	t of pinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability	
The questions whether industrially applicable	the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be have not been examined in respect of:	
the entire inter	rnational application.	
claims Nos	1-23 with respect to industrial applicability.	
ecause:		
the said intern	ational application, or the said claims Nos.  1-23  Illowing subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):	_
	rate sheet	
	以下代表的 2016年,1985年,1986年,1986年,1986年,1986年,1986年,1986年,1986年,1986年,1986年,1986年,1986年,1986年,1986年,1986年,1986年,19	
4- Associatio	1. The second se	
are so unclear	n, claims or drawings (indicate particular elements below) or said claims Nosthat no meaningful opinion could be formed (specify):	_
	en de la companya de La companya de la co	
	<del>-</del>	
the claims, or	said claims Nos are so inadequately support	ted
by the descrip	said claims Nos are so inadequately support orion that no meaningful opinion could be formed.	
no internation	nal search report has been established for said claims Nos.	<u> </u>

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/EP 99/07094

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

Claims 1-23 relate to subject matter which, in the view of the International Preliminary Examining Authority, falls within the scope of PCT Rule 67.1(iv). Therefore no expert report is established regarding the industrial applicability of the subject matter of these claims (PCT Article 34(4)(a)(i)).

WLANK (USPTO)

#### INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/EP 99/07094

 Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Statement			
Novelty (N)	Claims	1-23	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-23	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims		YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

This report makes reference to the following documents:

D1: Blood, 88(12), 1996, 4651-4658

D2: Annual Meeting International Society for Experimental Hematology, 25(8), 1997, page 879

D3: DE-A-197 10 497.

a) Novelty and inventive step

Claim 1 and dependent Claims 2-23 relate to a process for the active immunisation of patients against tumour cells. According to this process, treated tumour cells which are not capable of surviving following reinfusion are injected into the patient; the immunisation effect is strengthened by administering bispecific antibodies whose T cells are directed specifically against the tumour cells. Since the use of bispecific antibodies as well as treated non-viable tumour cells is crucial to this method, the subject matter of Claim 1 differs from that of the X category documents cited in the international search report. Whilst documents D1-D3 relate to the use of bispecific antibodies for combating tumours, none of these documents suggests the reinfusion of treated non-viable tumour cells. In D1 and D3 (see sections cited in the search report) tumor

PCT/EP 99/07094

cells are injected into an animal, but these are not treated cells intended to contribute to an active immunisation, but rather untreated, normally proliferating tumour cells which are injected in order to establish a tumour model and subsequently test the use of bispecific antibodies. Bispecific antibodies are used in D2 to cleanse ex vivo peripheral stem cells used in hematopoietic reconstruction following chemotherapy of contaminated tumour cells; treated non-viable tumour cells are not injected.

Therefore the subject matter of Claim 1 appears to be novel (PCT Article 33(2)). Since none of the documents contains any indication of the use of treated non-viable tumour cells in combination with bispecific antibodies to facilitate an active immunisation, Claim 1 also appears to meet the requirements of PCT Article 33(3).

Dependent Claims 2-23 relate to preferred embodiments of the novel and inventive method from Claim 1, and therefore also meet the requirements of PCT Article 33(2) and 33(3).

#### b) Industrial applicability

The PCT does not contain uniform criteria for assessing the industrial applicability of present Claims 1-23. Patentability may depend on the wording of the claims. The EPO, for example, does not recognise the industrial applicability of claims to the use of a compound in a medical treatment; it does, however, allow claims to the first use of a known compound in a medical treatment or the use of such a compound to manufacture a drug for a new medical treatment.

#### INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/EP 99/07094

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI

EP-A-0 885 614 (D4) was published on 23.12.1998, i.e. after the priority date (25.09.1998) of the present application. This document could therefore only be relevant if the claim to priority proved to be invalid for particular parts of the application. D4 discloses a process for immunisation against tumours which includes the following steps:

a) isolating autologous tumour cells

- b) treating the tumour cells so as to prevent their survival following reinfusion
- c) incubating the tumour cells thus treated with intact bispecific or trispecific antibodies
- d) reinfusing the antibody-carrying tumour cells.

The antibodies used in D4 are identical with the antibodies according to the present invention.

WASHIT TONG SIKI

# TATENT COOPERATION TF

To:

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT	То:		
NOTIFICATION OF ELECTION  (PCT Rule 61.2)	Assistant Commissioner for Patents United States Patent and Trademark Office Box PCT Washington, D.C.20231 ETATS-UNIS D'AMERIQUE		
Date of mailing (day/month/year) 16 May 2000 (16.05.00)	in its capacity as elected Office		
International application No. PCT/EP99/07094	Applicant's or agent's file reference P11655 Dr.B/La		
International filing date (day/month/year) 22 September 1999 (22.09.99)	Priority date (day/month/year) 25 September 1998 (25.09.98)		
Applicant LINDHOFER, Horst et al			
1. The designated Office is hereby notified of its election made    X   in the demand filed with the International Preliminary   18 April 2000 (   in a notice effecting later election filed with the International Preliminary   18 April 2000 (   was   was   was   was   was   was not   was not   was not   was not   was   was	Examining Authority on: 18.04.00) ational Bureau on:		
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer S. Mafla		

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aldenzeichen CT/EP 99/07094

UMWELT) 5. März 1998 (1998-03-05) in der Anmeldung erwähnt Seite 2, Zeile 35 -Seite 3, Zeile 6 Seite 5, Zeile 25-37 Beispiel ALL			C1/EF 99/0/094
Y CAMPBELL F A ET AL: "The role of tumor rejection antigens in host antitumor defense mechanisms." CANCER, (1995 JUN 1) 75 (11) 2649-55. REF: 88 , XP000877103 Seite 2649, linke Spalte, Zeile 21-25 Seite 2651, linke Spalte, Zeile 23-49 Seite 2652, linke Spalte, Zeile 34 -rechte Spalte, Zeile 40  X LINDHOFER H ET AL: "BISPECIFIC ANTIBODIES EFFECTIVELY PURGE CANCER CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD STEM CELL COLLECTIONS WITHOUT AFFECTING COLONY FORMING UNITS" ANNUAL MEETING INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, XX, XX, 8d. 25, Nr. 8, 24. August 1997 (1997-08-24), Seite 879 XP002048523 das ganze Dokument  X DE 197 10 497 A (GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT) 5. März 1998 (1998-03-05) in der Anmeldung erwähnt Seite 2, Zeile 35 -Seite 3, Zeile 6 Seite 5, Zeile 25-37 Beispiel ALL  P,X EP 0 885 614 A (GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT) 23. Dezember 1998 (1998-12-23) Spalte 3, Zeile 26-37 Beispiel 2			rmenden Telle Betr Anson ich Nr
rejection antigens in host antitumor defense mechanisms." CANCER, (1995 JUN 1) 75 (11) 2649-55. REF: 88 , XP000877103 Seite 2649, linke Spalte, Zeile 21-25 Seite 2651, linke Spalte, Zeile 23-49 Seite 2652, linke Spalte, Zeile 34 -rechte Spalte, Zeile 40  X LINDHOFER H ET AL: "BISPECIFIC ANTIBODIES EFFECTIVELY PURGE CANCER CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD STEM CELL COLLECTIONS WITHOUT AFFECTING COLONY FORMING UNITS" ANNUAL MEETING INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, XX, XX, Bd. 25, Nr. 8, 24. August 1997 (1997-08-24), Seite 879 XP002048523 das ganze Dokument  X DE 197 10 497 A (GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT) 5. März 1998 (1998-03-05) in der Anmeldung erwähnt Seite 2, Zeile 35 -Seite 3, Zeile 6 Seite 5, Zeile 25-37 Beispiel ALL  P,X EP 0 885 614 A (GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT) 23. Dezember 1998 (1998-12-23) Spalte 3, Zeile 26-37 Beispiel 2	Nate york	Second and Activities with condition card mine with the new mine condition.	BOUL PERSONNELLE
EFFECTIVELY PURGE CANCER CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD STEM CELL COLLECTIONS WITHOUT AFFECTING COLONY FORMING UNITS" ANNUAL MEETING INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, XX, XX, Bd. 25, Nr. 8, 24. August 1997 (1997-08-24), Seite 879 XP002048523 das ganze Dokument  X DE 197 10 497 A (GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT) 5. März 1998 (1998-03-05) in der Anmeldung erwähnt Seite 2, Zeile 35 -Seite 3, Zeile 6 Seite 5, Zeile 25-37 Beispiel ALL  P,X EP 0 885 614 A (GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT) 23. Dezember 1998 (1998-12-23) Spalte 3, Zeile 26-37 Beispiel 2	Y	rejection antigens in host antitumor defense mechanisms."  CANCER, (1995 JUN 1) 75 (11) 2649-55. REF: 88, XP000877103  Seite 2649, linke Spalte, Zeile 21-25  Seite 2651, linke Spalte, Zeile 23-49  Seite 2652, linke Spalte, Zeile 34 -rechte	
UMWELT) 5. März 1998 (1998-03-05) in der Anmeldung erwähnt Seite 2, Zeile 35 -Seite 3, Zeile 6 Seite 5, Zeile 25-37 Beispiel ALL  P,X  EP 0 885 614 A (GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT) 23. Dezember 1998 (1998-12-23) Spalte 3, Zeile 26-37 Beispiel 2	X	EFFECTIVELY PURGE CANCER CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD STEM CELL COLLECTIONS WITHOUT AFFECTING COLONY FORMING UNITS" ANNUAL MEETING INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, XX, XX, Bd. 25, Nr. 8, 24. August 1997 (1997-08-24), Seite 879 XP002048523	
UMWELT) 23. Dezember 1998 (1998-12-23) Spalte 3, Zeile 26-37 Beispiel 2	X	UMWELT) 5. März 1998 (1998-03-05) in der Anmeldung erwähnt Seite 2, Zeile 35 -Seite 3, Zeile 6 Seite 5, Zeile 25-37	1,5-16, 23
	P,X	UMWELT) 23. Dezember 1998 (1998-12-23) Spalte 3, Zeile 26-37 Beispiel 2	1-16,23

# **INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No CT/EP 99/07094

Patent document cited in search report		Publication dat	•	Patent family member(s)	Publication dat
DE 19710497	A	05-03-1998	EP	0826696 A	04-03-1998
			JP	10182487 A	07 <b>-</b> 07-1998
			DE	19649223 A	05-03-1998
			EP	0826695 A	04-03-1998
			JP	10179151 A	07-07-1998
			US	5985276 A	16-11-1999
EP 0885614	A	23-12-1998	DE	19725586 A	24-12-1998
			JP	11071288 A	16-03-1999

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. .mail Application No PCT/EP 99/07094

A. CLASSIF IPC 7	A61K39/395 A61K35/14 //C07K1	16/42,C07K16/28,C07K16/30	
According to	International Patent Classification (IPC) or to both national classification	fication and IPC	
B. FIELDS	BEARCHED		<u> </u>
Minimum do IPC 7	cumentation searched (classification system followed by classified CO7K	ation symbols)	
Documentati	ion searched other than minimum documentation to the extent that	t such documents are included in the fields sea	arched
Electronic de	ata base consulted during the International search (name of data	base and, where practical, search terms used)	
C. DOCUM	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the	relevant passages	Relevant to claim No.
X	LINDHOFER H ET AL: "BISPECIFIC TARGET OPERATIONALLY TUMOR-SPEC ANTIGENS IN TWO LEUKEMIA RELAPS BLOOD,US,PHILADELPHIA, PA, vol. 88, no. 12,	IFIC	1,4-16, 23
	15 December 1996 (1996-12-15), 4651-4658, XP000616201 ISSN: 0006-4971 abstract page 4654, left-hand column, pa -page 4655, left-hand column, p	ragraph 2	17-22
Y		-/	17-22
X Fur	ther documents are listed in the continuation of box C.	X Patent family members are seted	in annex.
"A" docum consi "E" earlier filing "L" docum which citati "O" docum other	estegories of cited documents:  nent defining the general state of the art which is not idered to be of particular relevance of document but published on or after the international date nent which may throw doubts on priority claim(s) or in is cited to establish the publication date of another on or other special reason (as specified)  ment referring to an oral disclosure, use, exhibition or rimeans.  nent published prior to the international filing date but then the priority date delimed.	"I" later document published after the integration or priority date and not in conflict with cited to understand the principle or the invention of the courage of the carnot be considered novel or cannot involve an inventive step when the decument of particular relevance; the cannot be considered to involve an indecument is combined with one or ments, such combination being obvict in the art.  "&" document member of the same patern	the application but be underlying the claimed invention in the considered to courient is taken alone claimed invention inventive step when the lore other such docupants a person skilled
1	e actual completion of the international search	Date of mailing of the international ed	earch report
	24 February 2000	15/03/2000	
Name and	i mailing address of the ISA  European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2  NL - 2280 HV Rijswijk  Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo ni,	Authorized officer  Covone, M	

5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intel anal Application No PCT/EP 99/07094

		FC1/EF 99/0/094
Category *	ation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u></u>		
Υ -	CAMPBELL F A ET AL: "The role of tumor rejection antigens in host antitumor defense mechanisms."  CANCER, (1995 JUN 1) 75 (11) 2649-55. REF: 88 , XP000877103 page 2649, left-hand column, line 21-25 page 2651, left-hand column, line 23-49 page 2652, left-hand column, line 34 -right-hand column, line 40	17-22
X	LINDHOFER H ET AL: "BISPECIFIC ANTIBODIES EFFECTIVELY PURGE CANCER CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD STEM CELL COLLECTIONS WITHOUT AFFECTING COLONY FORMING UNITS" ANNUAL MEETING INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, XX, XX, vol. 25, no. 8, 24 August 1997 (1997-08-24), page 879 XP002048523 the whole document	1,5-16, 23
X	DE 197 10 497 A (GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT) 5 March 1998 (1998-03-05) cited in the application page 2, line 35 -page 3, line 6 page 5, line 25-37 example ALL	1,5-16, 23
P,X	EP 0 885 614 A (GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT) 23 December 1998 (1998-12-23) column 3, line 26-37 example 2 claims	1-16,23

5

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In...nationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07094

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchlerbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)
Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:
1. X Ansprûche Nr. well sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich well sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
Ansprüche Nr.     well sie sich auf Telle der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr. well es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.
Feld II Bemerkungen bei mangeinder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)
Die Internationale Recherchenbehörde hat feetgestellt, daß diese Internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:
Da der Anmelder alle entorderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchlerbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.  Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erfordertichen zusätztichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recher-chenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwährte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen ertaßt
Bernerkungen hinelchtlich eines Widerspruchs  Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inten nales Aktenzeichen
PCT/EP 99/07094

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		tglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19710497	A	05-03-1998	EP JP DE EP JP US	0826696 A 10182487 A 19649223 A 0826695 A 10179151 A 5985276 A	04-03-1998 07-07-1998 05-03-1998 04-03-1998 07-07-1998 16-11-1999
EP 0885614	Α	23-12-1998	DE JP	19725586 A 11071288 A	24-12-1998 16-03-1999

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/EP 99/07094

Box I	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)
This int	ternational search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:
1. 🔀	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
•	Observation: Although Claims 1-23 relate to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2.	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)
This I	nternational Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
1.	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all
2.	searchable claims.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. [	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Kem	The additional search fees were accompanied by the applicant 3 protest.  No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inter anal Application No PCT/EP 99/07094

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 19710497	A	05-03-1998	JP 101824 DE 196493 EP 08266 JP 10179	223 A 695 A	04-03-1998 07-07-1998 05-03-1998 04-03-1998 07-07-1998 16-11-1999
EP 0885614	A	23-12-1998	DE 19725 JP 11071		24-12-1998 16-03-1999

**PCT** 

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowle Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	WEITERES siehe Mittellung über die Übermittung des Internationalen							
P11655 Dr.B/La		henberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit d, nachstehender Punkt 5						
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)						
PCT/EP 99/07094	22/09/1999	25/09/1998						
Anmelder	<u>.                                    </u>							
LINDHOFER, Horst								
Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kople wird dem internationalen Büro übermittelt.								
Dieser Internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.								
Darüber hinaus liegt ihm jewells eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bel.								
1. Grundlage des Berichts								
<ul> <li>a. Hinsichtlich der Sprache ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.</li> </ul>								
Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.								
b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten Nucleotid— und/oder Aminosäuresequenz ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolis durchgeführt worden, das								
in der Internationalen Anmeldung in Schrifflicher Form enthalten ist.								
zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.								
bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.								
	bei der Behörde nachträglich in computeriesbarer Form eingereicht worden ist.							
Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.								
Die Erklärung, daß die in co wurde vorgelegt.	Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoli entsprechen, wurde vorgelegt.							
2. X Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).								
3. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (slehe Feld II).								
4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung								
l								
ı <u> </u>	wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:							
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung								
wurde der Wortlaut nach Re Anmelder kann der Behörde	wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt. wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.							
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr								
wie vom Anmelder vorgesch	_	keine der Abb.						
well der Anmelder selbst ke	ne Abbildung vorgeschlagen hat.	<del>-</del>						
well diese Abbildung die Erf	indung besser kennzelchnet.							

Feld i Bernerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1
Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmt Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:
1. X Ansprüche Nr. well sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 1–23 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. Anaprüche Nr. weil sie sich auf Teile der Internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Anaprüche Nr. well es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.
Feld II Bemerkungen bei mangeinder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)
Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:
Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchlerbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenberlicht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs  Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen CT/EP 99/07094

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMEL IPK 7 A61K39/395

A61K35/14 //C07K16/42,C07K16/28,C07K16/30

Nach der Internationalen Patentidasstifikation (IPK) oder nach der nationalen Klasstifikation und der IPK

### B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 CO7K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Telle	Betr. Anspruch Nr.
Y	LINDHOFER H ET AL: "BISPECIFIC ANTIBODIES TARGET OPERATIONALLY TUMOR-SPECIFIC ANTIGENS IN TWO LEUKEMIA RELAPSE MODELS" BLOOD, US, PHILADELPHIA, PA, Bd. 88, Nr. 12, 15. Dezember 1996 (1996-12-15), Seiten 4651-4658, XP000616201 ISSN: 0006-4971 Zusammenfassung Seite 4654, linke Spalte, Absatz 2 -Seite 4655, linke Spalte, Absatz 1	1,4-16, 23

Wettere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	Siehe Anhang Patentifamille
<ul> <li>Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:</li> <li>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</li> <li>"E" älteree Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</li> <li>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</li> <li>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</li> <li>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach</li> </ul>	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondem nur zum Verständints des der Erfindung zugrundellegenden Prinzips oder der ihr zugrundellegenden Theorie angegeben ist  "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden  "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wern die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Veröffentlichung für einen Fachmann nahellegend ist
dem beanspruchten Prioritätisdatum veröffentlicht worden ist Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist  Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts
24. Februar 2000	15/03/2000
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentarnt, P.B. 5818 Patentiaan 2	Bevolimächtigter Bedlensteter
NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo ni, Fax: (+31-70) 340-3016	Covone, M

5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGEN
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7:

A61K 39/395, 35/14 // C07K 16/42, 16/28, 16/30

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 00/18435

- - (43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

6. April 2000 (06.04.00)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP99/07094

- (22) Internationales Anmeldedatum:
- 22. September 1999 (22.09.99)
- BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(30) Prioritätsdaten:

- 198 44 157.6 198 59 115.2
- 25. September 1998 (25.09.98) DE 21. Dezember 1998 (21.12.98) DE
- Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT,

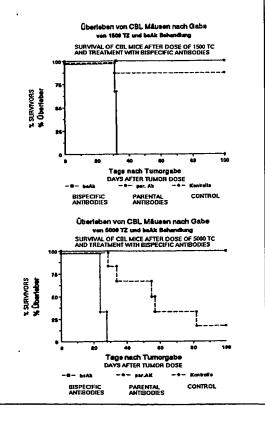
- (71)(72) Anmelder und Erfinder: LINDHOFER, Horst [DE/DE]; Bodenseestrasse 12, D-82194 Gröbenzell (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RUF, Peter [DE/DE]; Keltenstrasse 11, D-82296 Schöngeising (DE).
- (74) Anwalt: BEHNISCH, Werner, Reinhard-Skuhra-Weise & Partner GbR, Postfach 44 01 51, D-80750 München (DE).
- (54) Title: TIME-STAGGERED UTILIZATION OF TUMOR CELLS IN COMBINATION WITH INTACT ANTIBODIES FOR **IMMUNIZATION**
- (54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON TUMORZELLEN ZEITVERSETZT IN KOMBINATION MIT INTAKTEN ANTIKÖRPERN **ZUR IMMUNISIERUNG**

#### (57) Abstract

The invention relates to the time-staggered utilization of tumor cells in combination with intact, preferably heterologous antibodies for the immunization of humans and animals.

#### (57) Zusammenfassung

Die Erfindung beschreibt die Verwendung von Tumorzellen zeitversetzt in Kombination mit intakten, bevorzugt heterologen Antikörpern zur Immunisierung von Mensch und Tier.



## LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
ΑZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger '	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
— СМ- –	Kamerun		Korea	—PL —	Polen Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumānien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verwendung von Tumorzellen zeitversetzt in Kombination mit intakten Antikörpern zur Immunisierung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Tumorzellen zeitversetzt in Kombination mit intakten, bevorzugt heterologen Antikörpern zur Immunisierung von Mensch und Tier.

Die Immuntherapie durch Antikörper, insbesondere durch bispezifische oder trispezifische Antikörper, hat in den letzten Jahren an Bedeutung stetig zugenommen. Ein wesentliches Problem bei der Verwendung derartiger Antikörper in der Immuntherapie ist beispielsweise die Aktivierung der Immunzellen, z.B. der T-Lymphozyten.

In der DE 196 49 223 und der DE 197 10 495 sind intakte bispezifische und trispezifische Antikörper beschrieben, die zur

Immuntherapie eingesetzt werden. Diese bispezfischen und trispezifischen Antikörper sind befähigt, an eine T-Zelle, zumindest ein Antigen auf einer Zielzelle und durch ihren Fc-Teil
oder durch eine dritte Spezfität an Fc-Rezeptor positive Zellen
(akzessorische Zellen) zu binden.

Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine neue Verwendungsart eines Kombinationspräparates bereitzustellen, das sowohl Tumorzellen enthält, die so behandelt wurden, daß ihr Überleben nach Reinfusion verhindert wird, als auch intakte bispezifische und/trispezifische Antikörper, die gegen die Tumorzellen gerichtet sind.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß autologe Tumorzellen oder allogene Tumorzellen desselben Tumortyps, die je so behandelt wurden, daß ihr Überleben nach Reinfusion verhindert wird, zeitversetzt in Kombination mit intakten bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörpern, die die nachfolgenden Eigenschaften aufweisen:

- α) Binden an eine T-Zelle;
- Binden an zumindest ein Antigen auf einer Tumorzelle;
- γ) Binden durch ihren Fc-Teil (bei bispezifischen Antikörpern) oder durch eine dritte Spezifität (bei trispezifischen Antikörpern) an Fc-Rezeptor positiven Zellen,

an den zu immunisierenden Menschen oder das zu immunisierende Tier verabreicht werden.

Die Tumorzellen und die Antikörper bilden erfindungsgemäß eine funktionelle Einheit und werden in Form einer Kombination verabreicht, um zielgerichtet eine Immunisierung zu erreichen, wobei es für den Erfolg der Verwendung darauf ankommt, daß ihre Anwendung zeitlich abgestuft voneinander erfolgt. Dabei ist es grundsätzlich möglich, zunächst die behandelten Tumorzellen zu verabreichen und, zeitlich abgesetzt hiervon, die Antikörper, oder zunächst die Antikörper an den Patienten zu verabreichen

WO 00/18435 PCT/EP99/07094

3

und, zeitlich abgestuft hiervon, die Tumorzellen.

Der Zeitraum, der zwischen der Verabreichung der Tumorzellen und der Antikörper und vice versa liegt, beträgt bevorzugt ca. 1 - 48 Stunden. Besonders bevorzugt ist ein Zeitraum von 1 - 24 Stunden, weiterhin bevorzugt 1 - 12 Stunden. Weiterhin möglich sind Zeiträume von 1 - 6 Stunden oder 2 - 4 Stunden. Entscheidend für den Erfolg der vorliegenden Erfindung ist die zeitlich abgestufte Anwendung, wobei der anzuwendende Zeitraum auch von der Art des zu behandelnden Tumors und vom verwendeten Antikörper abhängen kann. Die jeweiligen optimalen Zeiträume können anhand von Versuchen vom Fachmann ermittelt werden.

Die verwendeten Tumorzellen sollen möglichst intakt verabreicht werden. Es ist jedoch auch notwendig, daß ihr Überleben nach Reinfusion verhindert wird. Hierzu hat es sich als sinnvoll herausgestellt, die Tumorzellen entweder zu bestrahlen oder durch chemische Agentien am Überleben nach Reinfusion zu verhindern. Durch diese beiden Behandlungsarten bleibt insbesondere die äußere Struktur der Tumorzellen unverändert, d.h. das Erkennungsmuster für die Antikörper.

Zur Bestrahlung wird bevorzugt eine γ-Bestrahlung eingesetzt, die vorzugsweise mit einer Dosis von 20 - 200 Gy erfolgt. Bei einer chemischen Behandlung hat sich Mitomycin C besonders bewährt. Besonders bevorzugt werden heterologe bispezifische und/oder trispezifische Antikörper eingesetzt.

Der Immunisierungserfolg kann dadurch weiter verbessert werden, daß die Antikörper und die Tumorzellen, je zeitlich getrennt voneinander, mehrfach verabreicht werden. Eine weitere Verbesserung der Immunogenität der Tumorzellen ist dadurch erreichbar, daß diese vor Infusion einer Hitzevorbehandlung unterzogen werden. Der bevorzugte Bereich liegt hier bei 41 - 42°C, wobei das Optimum durch Versuche ermittelt werden kann. Bevorzugte Ergebnisse werden bei einer Temperatur von ca. 41,8°C erzielt. Der Zeitraum für die Hitzevorbehandlung beträgt im allgemeinen

1 bis 6 Stunden, bevorzugt ca. 3 Stunden. Der Zeitraum als auch die Temperatur, die optimalerweise eingesetzt werden können, hängen von der Art des zu behandelnden Tumors ab. Die jeweiligen Optima können vom Fachmann anhand von Laborversuchen ermittelt werden.

Wie im syngenen (autologen) murinen Tumormodell gezeigt werden konnte, spielen für eine besonders erfolgreiche Induktion der Immunität auch noch weitere Faktoren eine nicht unerhebliche Rolle. So ist die räumlich korrekte Präsentation des Tumormaterials wichtig. Die Tumorzellen müssen den für eine Immunisierung verantwortlichen Immunzellen im richtigen räumlichen Kontext präsentiert werden. Eine intravenöse (i.v.), intraperitoneale (i.p.) oder subkutane (s.c.) Applikation hat sich hierbei als besonders günstig herausgestellt, da hierdurch der optimale Kontakt in diesen Kompartimenten mit den entsprechenden Immunzellen unter Anwendung der bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörper gewährleistet wird.

Zur erfolgreichen Immunisierung ist es weiterhin vorteilhaft, daß die Menge der verabreichten Tumorzellen in geeigneter Weise ausgewählt wird. So konnte in den Versuchen im murinen Tumormodell gezeigt werden, daß eine zu geringe Anzahl an Tumorzellen nicht den gewünschten Immunisierungserfolg bringt. Eine zu gro-Be Menge an Tumormaterial wiederum kann sich nachteilig auswirken, da beispielsweise Toleranzphänomene auftreten können. Überträgt man diese Resultate auf die Situation im Patienten, heißt dies, daß es für den Immunisierungserfolg vorteilhaft ist, eine definierte Menge an Tumormaterial im korrekten räumlichen Kontext mit einer ebenfalls definierten Menge an Antikörpern zu verabreichen. Ein Immunisierungserfolg stellt sich zwar auch dann ein, wenn einer dieser Parameter nicht optimiert wurde; besonders gute Ergebnisse werden jedoch erzielt, wenn sowohl die Mengen des Antikörpers als auch die Menge an Tumormaterial als auch der räumliche Kontext aufeinander abgestimmt und optimiert wurden.

Unter Berücksichtigung der obigen Ausführungen kann bei einer zu geringen Tumorzellzahl beispielsweise nur ein unzureichender Immunschutz etabliert werden. Daher ist es für einen vollständigen Immunisierungserfolg notwendig, mit einer definierten Anzahl an aktivierten Tumorzellen und einer definierten Menge an bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörpern zu immunisieren. Die jeweiligen Zahlen können vom Fachmann anhand von Versuchen etabliert werden.

Die erfindungsgemäß eingesetzten bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörper werden bevorzugt in einer Menge von 5 - 500 µg, weiterhin bevorzugt 10 - 300 µg, 10 - 100 µg oder 10 - 50 µg, je pro Infusion, verabreicht. Die Menge des eingesetzten Antikörpers hängt von der Art des zu behandelnden Tumors, von der Reaktion des Patienten und weiteren Faktoren ab. Die optimalen Mengen können vom Fachmann anhand von Versuchen ermittelt werden.

Die Tumorzellen werden bevorzugt in einer Menge von 10<sup>7</sup> - 10<sup>9</sup> Zellen pro Infusion verabreicht, wobei sich eine Zellzahl von ca. 10<sup>8</sup> als bevorzugt herausgestellt hat. Die Tumorzellen wurden, wie oben ausgeführt, vor der Reinfusion so behandelt, daß ihr Überleben nach Reinfusion verhindert wird, wobei sie wahlweise zusätzlich einer Hitzevorbehandlung unterzogen werden können. Nähere Ausführungen hierzu sind in der vorliegenden Beschreibung enthalten.

Unumgänglich ist jedoch die zeitlich versetzte Verabreichung der Tumorzellen und der Antikörper. Dadurch wird gewährleistet, daß durch die Injektion des bispezifischen und/oder trispezifischen, bevorzugt heterologen Antikörpers in den zu behandelnden Tieren oder Menschen zunächst aufgrund des Überschusses an vorhandenen T-Lymphozyten im peripheren Blut diese über den hochaffinen Bindungsarm gebunden und präaktiviert werden. Zusätzlich können auch vorhandene Fc-Rezeptor positive akzessorische Immunzellen über den Fc-Anteil des bispezifischen oder trispezifischen Antikörpers gebunden werden. Wird nun dieser

Zellkomplex aus T-Zelle und Fc-Rezeptor positiver Zelle über den zweiten hochaffinen Tumorbindungsarm an die vergleichsweise in geringer Anzahl vorhandenen Tumorzellen herangeführt, werden diese durch T-Lymphozyten bzw. Fc-Rezeptor positiven Zellen zerstört und über die in den Zellkomplex eingebundenen Fc-Rezeptor positiven Zellen, beispielsweise Makrophagen, phagozytiert. Dies konnte in einem Versuch mit markierten humanen Monozyten/Makrophagen und Tumorzellen bereits gezeigt werden. In einem nächsten Schritt wird das aufgenommene Tumormaterial prozessiert und über MHC Klasse I und insbesondere Klasse II Moleküle dem Immunsystem präsentiert, was eine wichtige Voraussetzung für die beobachtete humorale Immunantwort darstellt.

Wie das erfindungsgemäße Beispiel zeigt, setzt der Nachweis von tumorreaktiven Antikörpern, die nach einer Therapie gebildet wurden, die Aktivierung von CD4+ tumorspezifischen T-Lymphozyten voraus, die über die T-B-Zell-Kooperation tumorspezifische B-Zellklone stimulieren können. Durch den Nachweis der humoralen Immunantwort konnte somit indirekt ebenfalls eine zelluläre CD4-T-Zellantwort nachgewiesen werden und somit das Überleben der Mäuse als Folge der erfindungsgemäßen zeitlich versetzten Gabe von Tumorzellen und Antikörpern erklärt werden.

### BEISPIEL

In einem murinen, autologen Tumormodell wurde der Aufbau eines langanhaltenden Immunschutzes gegen den Tumor mit Hilfe von bsAk untersucht. Hierzu wurde C57BL/6 Mäusen zunächst eine an sich letale Dosis an autologen Melanomzellen verabreicht und zwei Tage später parentale bzw. bispezfische Antikörper nachin-jiziert. Um zu testen, ob in den Mäusen hierbei ein langanhaltender Immunschutz aufgebaut worden ist, wurden die überlebenden Mäuse nach 100 Tagen einer erneuten Tumorgabe, diesmal jedoch ohne Ak, unterzogen. Um ferner der Frage nachzugehen, inwieweit für die Entwicklung des Immunschutzes die Anzahl an

7

verabreichten Tumorzellen eine Rolle spielt, wurden die Versuche mit einer niedrigen Tumordosis von 1500 Tumorzellen (TZ) sowie mit einer hohen Dosis von 5000 Tumorzellen durchgeführt. Neben dem Überleben der Mäuse wurde darüber hinaus eine vorhandene humorale Immunantwort gegen den Tumor als Kriterium für einen vorliegenden Immunschutz herangezogen. Hierzu wurden die Seren der Mäuse vor und 100 Tage nach der Behandlung (unmittelbar vor der erneuten Tumorgabe) auf das Vorhandensein von anti-Tumorantikörpern miteinander verglichen.

Die Abbildung 1 zeigt die Überlebenskurven der Mäuse nach der primären Tumorgabe von 1500 bzw. 5000 Tumorzellen. Während di Kontrollmäuse ohne Antikörper-Behandlung alle innerhalb von 35 Tagen verstarben, konnten sämtliche mit bsAk behandelten Mäuse geheilt werden. Im Vergleich hierzu überlebten von den Mäusen, die mit einer Kombination aus den beiden parentalen Ak behandelt wurden, nur 84% nach der niedrigen Tumordosis und nur 16% nach der hohen Tumordosis.

Dieser qualitative Unterschied zwischen den bsAk und den parentalen Ak machte sich auch bei der Ausbildung einer humoralen Immunantwort bemerkbar. Die Abbildung 2 zeigt die in der Durchflußzytometrie gemessene humorale Immunantwort gegen die Tumorzellen. Während die Überlebenden aus der "parentalen Gruppe" keine humorale Immunantwort aufwiesen, zeigte sich dies bei den Mäusen aus der "bispezifischen Gruppe". Besonders wichtig hierfür war allerdings die Menge an verabreichtem Tumormaterial. Es gab einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen mit niedrig- und hochdosierter Tumorgabe. Während nach niedriger verabreichter Tumordosis nur 17% der Mäuse einen starken und 33% einen schwachen Titer aufwiesen, konnte nach der höheren Tumordosis bei 66% der Mäuse ein starker Titer nachgewiesen werden.

Des weiteren korrelieren die gewonnenen Daten zur humoralen Immunantwort eindeutig mit dem Überleben der Mäuse nach erneuter Tumorgabe ohne nachfolgende Antikörper-Injektion. Nur die Mäuse, die einen starken Antikörper-Titer gegen den Tumor aufgebaut hatten, überlebten die Tumorgabe oder starben stark verzögert im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Immunisierung. Hingegen starben alle Mäuse ohne nachweisbaren Titer zuerst und ohne Verzögerung im Vergleich zur Kontrolle. In Abbildung 3 sind die Überlebenskurven der Mäuse dargestellt, die einer erneuten Tumorgabe unterzogen wurden ohne diese Mäuse anschließend wieder mit Antikörper zu behandeln. Die Mäuse, die eine hohe Primärgabe von 5000 TZ erhalten hatten, besaßen einen deutlichen Überlebensvorteil gegenüber den Mäusen mit einer niedrig dosierten Primärtumorgabe von 1500 TZ.

Nachfolgend werden bevorzugte Ausgestaltungen der Erfindung, insbesondere in Bezug auf die zu verwendenden bispezifischen und trispezifischen Antikörper und die Tumorzellen, offenbart.

Die Tumorzellen werden aus einem Patienten entnommen (autologe Tumorzellen). Um ein Überleben der Tumorzellen nach Reinfusion zu verhindern, werden sie vor dem Inkontaktbringen mit den Antikörpern, was ja erfindungsgemäß erst im Körper erfolgt, in an sich bekannter Weise behandelt, beispielsweise durch Bestrahlung. Erfindungsgemäß sind nicht beliebige Antikörper verwendbar, sondern diese müssen intakt sein, d.h. sie müssen eine funktionellen Fc-Teil besitzen. Bevorzugt sind sie heterologer Natur, d.h. die Antikörper sind aus schweren Immunglobulinketten unterschiedlicher Subklassen (-Kombinationen, auch Fragmente) und/oder Herkunft (Spezies) zusammengesetzt.

Diese intakten heterologen bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörper werden so ausgewählt, daß sie weiterhin die nachfolgenden Eigenschaften aufweisen:

- $\alpha$  Binden an eine T-Zelle;
- β Binden an zumindest ein Antigen auf einer Tumorzelle;
- γ Binden durch ihren Fc-Teil (bei bispezifischen Antikörpern) oder durch eine dritte Spezifität (bei trispezifischen Antikörpern) an Fc-Rezeptor positive Zellen.

Die erfindungsgemäß verwendbaren Antikörper sind befähigt, die Fc-Rezeptor positive Zelle zu aktivieren, wodurch die Expression von Zytokinen und/oder kostimulatorischen Antigenen initiiert oder erhöht wird.

Bei den trispezifischen Antikörpern erfolgt die Bindung an die Fc-Rezeptor positiven Zellen bevorzugt beispielsweise über den Fc-Rezeptor von Fc-Rezeptor positiven Zellen oder auch über andere Antigene auf Fc-Rezeptor positiven Zellen (Antigen-präsentierenden Zellen), wie z.B. den Mannose-Rezeptor.

Durch die erfindungsgemäße, zeitlich abgestufte Anwendung der intakten, bevorzugt heterologen bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörper wird im Patienten eine Tumorimmunität aufgebaut, bevorzugt eine Langzeit-Tumorimmunität. Die Verabreichung (Reinfusion) erfolgt bevorzugt in einem Patienten nach der Behandlung des Primärtumors, bevorzugt bei Patienten in einer minimal residual disease (MRD)-Situation. Bei Patienten mit wenig verbliebenen Tumorzellen, bei denen allerdings die Gefahr eines Rezidivs hoch sein kann, ist die erfindungsgemäß beschriebene zeitlich abgestufte Anwendung besonders erfolgreich.

Die erfindungsgemäß verwendbaren heterologen bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörper sind zum Teil an sich bekannt, zum Teil werden sie aber auch in der vorstehenden Anmeldung zum ersten Mal beschrieben. Ein Beispiel für einen bsAk ist der Antikörper anti-CD3 X anti-EpCAM (GA-733-2) der bei epithelialen Tumoren wie dem Mammacarcinom eingesetzt wird.

Auf der Tumorzelle erfolgt eine Hochregulation von MHC 1, sowie eine Aktivierung der intrazellulären Prozessierungsmaschinerie (Proteasom-Komplex) aufgrund der Freisetzung von Zytokinen (wie z.B. INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ ) in unmittelbarer Nachbarschaft der Tumorzelle. Die Zytokine werden aufgrund bispezifischer Antikörpervermittelter Aktivierung von T-Zellen und akzessorischen Zellen freigesetzt. D.h. durch den intakten bsAk werden nicht nur Tu-

10

morzellen zerstört oder phagozytiert, sondern indirekt auch deren Tumorimmunogenität erhöht.

Die Aktivierung der Fc-Rezeptor positiven Zelle durch den bsAk ist von der Subklasse bzw. der Subklassenkombination des bsAk abhängig. Wie in in vitro-Versuchen nachgewiesen werden konnte, sind beispielsweise bsAk der Subklassenkombination Maus-IgG2a/-Ratte-IgG2b in der Lage, an Fc-Rezeptor positive Zellen zu binden und diese gleichzeitig zu aktivieren, was zur Hochregulation bzw. Neuausbildung (Expression) von kostimulatorischen Antigenen, wie z.B. CD40, CD80 oder CD86, auf der Zelloberfläche dieser Zellen führt. Dagegen sind bsAk der Subklassenkombination Maus-IgG1/IgG2b zwar in der Lage an Fc-Rezeptor positive Zellen zu binden (1) Haagen et al., J. Immunology, 1995, 154: 1852-1860, können diese aber offenbar nicht in vergleichbarem Maße aktivieren (2) Gast et al., Cancer Immunol. Immuntherap., 1995, 40: 390.

Während der intakte bsAk die T-Zelle mit einem Bindungsarm (z.B. an CD3 oder CD2) bindet und gleichzeitig aktiviert, können kostimulatorische Signale von der an den Fc-Teil des bsAk gebundenen Fc-Rezeptor positiven Zelle an die T-Zelle übermittelt werden. D.h. erst die Kombination von Aktivierung der T-Zelle über einen Bindungsarm des bsAk und der gleichzeitigen Übertragung von kostimulatorischen Signalen von der Fc-Rezeptor positiven Zelle auf die T-Zelle, führt zu einer effizienten T-Zellaktivierung (Abb. 4A). Tumor-spezifische T-Zellen, die an der Tumorzelle ungenügend aktiviert wurden und anergisch sind, können nach der erfindungsgemäßen ex vivo-Vorbehandlung ebenfalls reaktiviert werden (Abb. 4B).

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Induktion einer Tumorimmunität ist die mögliche Phagozytose, Prozessierung und Präsentation von Tumorbestandteilen durch die vom bsAk herangeführten und aktivierten akzessorischen Zellen (Monozyten/Makrophagen, oder dendritische Zellen). Durch diesen klassischen Mechanismus der Präsentation von Antigenen können sowohl tumorspezifische CD4- wie auch CD8-positive Zellen generiert werden. Tumorspezifische CD4-Zellen spielen darüberhinaus eine wichtige Rolle für die Induktion einer humoralen Immunantwort im Zusammenhang mit der T-B-Zell Kooperation.

Bispezifische und trispezifische Antikörper können mit einem Bindungsarm an den T-Zellrezeptor-Komplex der T-Zelle, mit dem zweiten Bindungsarm an tumorassoziierte Antigene auf der Tumorzelle binden. Sie aktivieren dabei T-Zellen, die durch Freisetzung von Zytokinen oder Apoptose-vermittelnde Mechanismen die Tumorzellen zerstören. Darüber hinaus besteht offenbar die Möglichkeit, daß T-Zellen im Rahmen der Aktivierung mit bispezifischen Antikörpern tumorspezifische Antigene über ihren Rezeptor erkennen und dadurch eine dauerhafte Immunisierung eingeleitet wird (Abb. 4B). Von besonderer Bedeutung ist dabei der intakte Fc-Teil des bispezifischen oder trispezifischen Antikörpers, der die Bindung an akzessorische Zellen wie z.B. Monozyten/Makrophagen und dendritische Zellen vermittelt und diese veranlaßt selbst zytotoxisch zu werden und/oder gleichzeitig wichtige kostimulatorische Signale an die T-Zelle weiterzugeben. Auf diese Weise kann offensichtlich eine T-Zellantwort u.U. auch gegen bislang unbekannte, tumorspezifische Peptide induziert werden.

Durch Redirektion von u.U. anergisierten, tumorspezifischen T-Zellen an Tumorzellen mittels bispezifischer und/oder trispezifischer Antikörper bei gleichzeitiger Kostimulation derartiger T-Zellen durch akzessorische Zellen welche an den Fc-Teil des bispezifischen oder trispezifische Antikörpers binden, könnte die Anergie von zytotoxischen T-Zellen (CTLs) aufgehoben werden. D.h. eine im Patienten gegen den Tumor existierende T-Zell-Toleranz kann mittels intakter heterologer bispezifischer und/oder trispezifischer Antikörper gebrochen und damit eine dauerhafte Tumorimmunität induziert werden.

Für den letzten Punkt gibt es erste in vivo-Daten aus Mausversuchen, die auf eine derartige dauerhafte Tumorimmuntät nach Behandlung mit einem syngenen Tumor und intakten bsAk hinweisen. In diesen Versuchen überlebten insgesamt 14 von 14 Tieren, die nach einer ersten Tumorinjektion erfolgreich mit bsAk behandelt werden konnten, eine weitere Tumorinjektion 144 Tage nach der ersten Tumorinjektion - ohne eine erneute Gabe von bsAk.

Die erfindungsgemäß eingesetzten Antikörper sind bevorzugt zur Reaktivierung von in Anergie befindlichen, tumorspezifischen T-Zellen befähigt. Weiterhin sind sie zur Induktion von tumorreaktiven Komplement-bindenden Antikörpern und damit zur Induktion einer humoralen Immunantwort in der Lage.

Die Bindung erfolgt bevorzugt über CD3, CD2, CD4, CD5, CD6, CD8, CD28 und/oder CD44 an die T-Zelle. Die Fc-Rezeptor positiven Zellen weisen zumindest einen Fcy-Rezeptor I, II oder III auf.

Erfindungsgemäß einsetzbare Antikörper sind zur Bindung an Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, "Natural Killer"-Zellen (NK-Zellen) und/oder aktivierte neutrophile Zellen als Fcγ-Rezeptor l und/oder III positive Zellen befähigt.

Die erfindungsgemäß einsetzbaren Antikörper bewirken, daß die Expression von CD40, CD80, CD86, ICAM-1 und/oder LFA-3 als kostimulatorische Antigene oder/und die Sekretion von Zytokinen durch die Fc-Rezeptor positive Zelle initiiert oder erhöht wird. Die Zytokine sind bevorzugt IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, INF- $\gamma$  und/oder TNF- $\alpha$ .

Die Bindung an die T-Zelle erfolgt bevorzugt über den T-Zell-Rezeptor-Komplex der T-Zelle.

Die erfindungsgemäß einsetzbaren bispezifischen Antikörper sind beispielsweise:

ein anti-CD3 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder

anti-CD4 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD5 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD6 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD8 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD2 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD28 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD28 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen-Antikörper ist.

Die erfindungsgemäß einsetzbaren trispezifischen Antikörper sind bevorzugt:

ein anti-CD3 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD4 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD5 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD6 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD8 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD2 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD28 X anti-Tumorassoziiertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen-Antikörper.

Die erfindungsgemäß einsetzbaren trispezfischen Antikörper weisen zumindest eine T-Zell-Bindungsarm, einen Tumorzell-Bindungsarm und einen an Fc-Rezeptor positive Zellen bindenden Bindungsarm auf. Dieser zuletzt genannte Bindungsarm kann ein anti-Fc-Rezeptor-Bindungsarm oder ein Mannose-Rezeptor-Bindungsarm sein.

Der bispezifische Antikörper ist bevorzugt ein heterologer intakter Ratte/Maus bispezifischer Antikörper.

Mit den erfindungsgemäß einsetzbaren bispezifischen und trispezifischen Antikörpern werden T-Zellen aktiviert und gegen die Tumorzellen redirigiert. Bevorzugt einsetzbare heterologe intakte bispezifische Antikörper werden aus einer oder mehreren der nachfolgenden Isotyp-Kombinationen ausgewählt:

```
Ratte-IgG2b/Maus-IgG2b,
Ratte-IgG2b/Maus-IgG3,
Ratte-IgG2b/Human-IgG1,
Ratte-IgG2b/Human-IgG2,
Ratte-IgG2b/Human-IgG3[orientaler Allotyp G3m(st) = Bin-
dung an Protein A],
Ratte-IgG2b/Human-IgG4,
Ratte-IgG2b/Ratte-IgG2c,
Maus-IgG2a/Human-IgG3[kaukasische Allotypen G3m(b+g) =
keine Bindung an Protein A, im folgenden mit * gekenn-
zeichnetl
Maus-IgG2a/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-
Human-IgG3*-[CH2-CH3]
Maus-IgG2a/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-
IgG3*-[CH2-CH3]
Maus-IgG2a/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-
IgG3*-[CH2-CH3]
Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-
Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]
Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-
IgG4-[Hinge]-Human-IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-
IgG3*[C-terminale Region von CH2: > AS-Position 251]-Hu-
man- IgG3*[CH3]
Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge-CH2-CH3]
Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG2-[Hinge-CH2-CH3]
Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG3-[Hinge-CH2-CH3,
```

orientaler Allotyp]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge-CH2-CH3]

Human-IgG1/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-HumanIgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-HumanIgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-HumanIgG2[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-HumanIgG2[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-HumanIgG3\*-[CH2-CH3]

Human-IgG2/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG2-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Human-IgG4/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Human-IgG4/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale

Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]

Maus-IgG2b/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2b/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2b/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-Human-IgG3\*-[CH3]

HumanIgG1/Ratte[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-HumanIgG3\*[CH3]

HumanIgG1/Maus[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-Human-IgG3\*[CH3]

Human-IgG4/Human[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-HumanIgG3\*-[CH3]

Bei den erfindungsgemäß verwendbaren Antikörpern handelt es sich vorzugsweise um monoklonale, chimäre, rekombinante, synthetische, halbsynthetische oder chemisch modifizierte intakte Antikörper mit beispielsweise Fv-, Fab-, scFv- oder  $F(ab)_2$ -Fragmenten.

Bevorzugt werden Antikörper oder Derivate oder Fragmente vom Menschen verwendet oder solche, die derart verändert sind, daß sie sich für die Anwendung beim Menschen eignen (sogenannte "humanized antibodies") (siehe z.B. Shalaby et al., J. Exp. Med. 175 (1992), 217; Mocikat et al., Transplantation 57

Med. 175 (1992), 217; Mocikat et al., Transplantation 57 (1994), 405).

Die Herstellung der verschiedenen oben genannten Antikörperty-

pen und -fragmente ist dem Fachmann geläufig. Die Herstellung monoklonaler Antikörper, die ihren Ursprung vorzugsweise in Säugetieren, z.B. Mensch, Ratte, Maus, Kaninchen oder Ziege, haben, kann mittels herkömmlicher Methoden erfolgen, wie sie z.B. in Köhler und Milstein (Nature 256 (1975), 495), in Harlow und Lane (Antibodies, A Laboratory Manual (1988), Cold Spring Harbor) oder in Galfré (Meth. Enzymol. 73 (1981), 3) oder der DE 195 31 346 beschrieben sind.

Ferner ist es möglich, die beschriebenen Antikörper mittels rekombinanter DNA-Technologie nach dem Fachmann geläufigen Techniken herzustellen (siehe Kurucz et al., J. Immunol. 154 (1995), 4576; Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sc. USA 90 (1993), 6444).

Die Herstellung von Antikörpern mit zwei verschiedenen Spezifitäten, den sogenannten bispezifischen Antikörpern, ist zum einen durch Anwendung rekombinanter DNA-Technologie möglich, aber auch durch die sogenannte Hybrid-Hybridoma-Fusionstechnik (siehe z.B. Milstein et al., Nature 305 (1983), 537). Hierbei werden Hybridomazellinien, die Antikörper mit jeweils einer der gewünschten Spezifitäten produzieren, fusioniert und rekombinante Zellinien identifiziert und isoliert, die Antikörper mit beiden Spezifitäten produzieren.

Das der Erfindung zugrunde liegende Problem kann sowohl durch bispezifische als auch trispezifische Antikörper gelöst werden, sofern sie die im Anspruch 1 gekennzeichneten Eigenschaften und Wirkungen aufweisen. Nachfolgend wird die Herstellung von Antikörpern mit Zwei- und Dreispezifitäten näher beschrieben. Die Bereitstellung derartiger bispezifischer und trispezifischer Antikörper gehört zum Stand der Technik, und auf die derartige Herstellungstechniken beschreibende Literatur wird hier voll inhaltlich Bezug genommen.

Die Herstellung von Antikörpern mit drei Spezifitäten, sogenannten trispezifischen Antikörpern, durch die das der Erfindung zugrundeliegende Problem ebenfalls lösbar ist, kann beispielsweise derart erfolgen, daß an eine der schweren Ig-Ketten
eines bispezifischen Antikörpers eine dritte Antigenbindungsstelle mit einer weiteren Spezifität, z.B. in Form eines "single chain variable fragments" (scFv), angekoppelt wird. Das scFv
kann beispielsweise über einen

-S-S(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>D-I-Linker

an eine der schweren Ketten gebunden sein (S = Serin, G = Glycin, D = Aspartat, I = Isoleucin).

Analog dazu können trispezifische F(ab)<sub>2</sub>-Konstrukte hergestellt werden, indem die CH2-CH3-Regionen der schweren Kette einer Spezifität eines bispezifischen Antikörpers ersetzt werden durch ein scFv mit einer dritten Spezifität, während die CH2-CH3-Regionen der schweren Kette der anderen Spezifität beispielsweise durch Einbau eines Stopcodons (am Ende der "Hinge"-Region) in das codierende Gen, z.B. mittels homologer Rekombination, entfernt werden (siehe Abb.5).

Möglich ist auch die Herstellung trispezifischer scFv-Konstrukte. Hierbei werden drei VH-VL-Regionen, die drei verschiedene Spezifitäten repräsentieren, hintereinander in Reihe angeordnet (Abb.6).

Erfindungsgemäß werden z.B. intakte bispezifische Antikörper verwendet. Intakte bispezifische Antikörper sind aus zwei Antikörper-Halbmolekülen (je eine H- und L-Immunglobulinkette), die jeweils eine Spezifität repräsentieren, zusammengesetzt, und besitzen darüber hinaus, wie normale Antikörper auch, einen Fc-Teil mit den bekannten Effektorfunktionen. Sie werden bevorzugt durch die Quadrom-Technologie hergestellt. Dieses Herstellungsverfahren ist beispielhaft in der DE-A-44 19 399 beschrieben. Auf diese Druckschrift, auch bzgl. einer Definition der bispezifischen Antikörper, wird zur vollständigen Offenbarung vollinhaltlich Bezug genommen. Selbstverständlich sind auch andere Herstellungsverfahren einsetzbar, solange sie zu den erfindungsgemäß notwendigen intakten bispezifischen Antikörpern der

angeführt, die erfindungsgemäß direkt am Tumor reaktiviert werden können. Dies kann durch ein bsF(ab')2-Fragment mit den Spezifitäten anti-CD64Xanti-tumorassoziiertes Antigen nicht erreicht werden.

3. Ein bsF(ab')2-Fragment mit den Spezifitäten anti-CD64Xanti-tumorassoziiertes Antigen kann lediglich eine Tumorimmunität in 30% der Patienten erzielen, während erfindungsgemäß in Mausversuchen mit T-Zell-redirigierenden intakten bsAk ein Schutz in 100% der Tiere erzielt werden konnte.

Die Bindung des bsAk an Fcy-RI besitzt zwei wesentliche Vorteile im Hinblick auf eine optimale anti-Tumorwirksamkeit:

- (1) Fcγ-RI positive Zellen besitzen die Fähigkeit mittels ADCC Tumorzellen zu eliminieren und können insofern synergistisch zur anti-Tumorwirkung der durch den bsAk an die Tumorzelle herangeführten cytotoxischen T-Zellen beitragen.
- (2) Fcy-RI positive Zellen (wie z.B. Monozyten/Makrophagen/-Dendriten) sind in der Lage, wichtige kostimulatorische Signale, ähnlich wie bei der Antigen-Präsentation, der T-Zelle zu liefern und damit eine Anergisierung der T-Zelle zu verhindern. Wie in Abbildung 4 gezeigt können weiterhin, als erwünschtes Nebenprodukt, aufgrund der durch intakten bsAk vermittelten Interaktion von T-Zelle mit akzessorischer Zelle und Tumorzelle sogar T-Zellen, deren T-Zellrezeptor tumorspezifische Peptide (über MHC Antigene auf der Tumorzelle präsentiert) erkennt, stimuliert werden. Die für eine korrekte Aktivierung der T-Zelle notwendigen Kostimuli würden in dieser Konstellation von der akzessorischen Zelle (z.B. Monocyt) geliefert werden. Insofern sollte der erfindungsgemäße Antikörper neben der direkten T-Zellrezeptor-unabhängigen, durch bsAk vermittelten Tumorzerstörung (Abb.4A) ebenfalls tumorspezifisch T-Zellen aktivieren und generieren (Abb.4B), die nach Ab-

19

obigen Definition führen.

Beispielsweise können in einem neu entwickelten Herstellungsverfahren (6) intakte bispezifische Antikörper in ausreichender Menge produziert werden. Die Kombination von 2 bispezifischen Antikörpern gegen 2 unterschiedliche tumorassoziierte Antigene (z.B. c-erb-B2, ep-cam, beispielsweise GA-733-2 = C215) auf den Mammakarzinomzellen minimiert die Gefahr, daß Tumorzellen, die nur ein Antigen exprimieren, unerkannt bleiben.

Es wurde auch versucht, durch Behandlung mit bispezifischen F(ab')2-Fragmenten mit den Spezifitäten anti-c-erb-B2 x antiCD64 eine Tumorimmunität zu erreichen. Der Hauptnachteil von bsF(ab')2-Fragmenten liegt darin, daß aufgrund der verwendeten Spezifitäten lediglich FcyRI+ Zellen an den Tumor redirigiert werden. T-Zellen werden durch diesen bispezifischen Anti-körper nicht an den Tumor redirigiert. Die FcyRI+ Zellen können zwar indirekt durch Präsentation von tumorspezifischen Peptiden (über MHC I bzw. MHCII) nach z.B. Phagozytose von Tumorzellbestandteilen tumorspezifische T-Zellen aktivieren, die Effizienz der Induktion einer Tumorimmunität ist hier aber niedriger, da T-Zellen durch diesen bsAK nicht gebunden werden und auch nicht zur Kostimulation der Fc-Rezeptor positiven Zellen beitragen können.

Weitere Vorteile von intakten bsAk mit der Fähigkeit zur Redirektion von T-Zellen gegenüber den o.g. bsF(ab')2 Fragmenten sind im einzelnen:

- An intakte bsAk können Fc-Rezeptor positive Zellen binden und einerseits über ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) direkt zur Tumorzerstörung beitragen sowie andererseits wie oben näher ausgeführt zur T-Zellaktivierung.
- Durch intakte T-Zell-redirigierende bsAk werden auch anergisierte tumorspezifische T-Zellen an die Tumorzelle her-

bau der bsAk weiterhin im Patienten patrouillieren. D.h. mittels intakter bsAk kann ähnlich wie bei gentherapeutischen Ansätzen (z.B. durch Einbau von kostimulatorischen Antigenen wie B-7 in die Tumorzelle) die Tumortoleranz im Patienten durchbrochen werden.

Günstig in diesem Zusammenhang ist weiterhin, daß die Expression von Fcy-RI nach G-CSF -Behandlung auf den entsprechenden Zellen hochreguliert wird.

Die erfindungsgemäß eingesetzten intakten, bevorzugt herterologen spezifischen und/oder trispezifischen Antikörper weisen in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung die nachfolgenden Eigenschaften auf:

- a) Binden an eine T-Zelle;
- b) Binden an zumindest ein Antigen auf einer Zielzelle;
- c) Binden durch ihren Fc-Teil (bei bispezifischen Antikörpern) oder durch eine dritte Spezifität (bei trispezifischen Antikörpern) an Fc-Rezeptor positive Zellen

und sie induzieren hierdurch eine Immunantwort und/oder zerstörte Zielzellen, wobei der Antikörper so ausgewählt ist, daß er an ein Oberflächenantigen als Zielantigen auf der Zielzelle bindet, welches induzierbar ist und im nicht induzierten Zustand (Normalzustand) auf der Zielzelle nicht vorkommt oder in einer derart geringen Zahl, daß die Anzahl für eine Zerstörung der Zielzelle nicht ausreicht. (Abb. 7A + B)

Es konnte gezeigt werden, daß nach Induktion bereits eine relativ geringe Anzahl der Zielantigene auf der Zielzelle ausreichend ist, um die intakten bispezifischen und trispezifischen Antikörper zu binden und eine Zerstörung der Zielzelle und/oder eine Immunantwort einzuleiten. Unter "geringe Anzahl" wird erfindungsgemäß eine Anzahl von Zielantigenen auf der Zielzelle von mehr als 100 Zielantigenen pro Zielzelle, bevorzugt mehr als 300 und weiterhin bevorzugt mehr als 1000 Zielantigenen pro

WO 00/18435 PCT/EP99/07094

Zelle verstanden. Die induzierbaren Zielantigene können auch in einer Menge von bis zu 500.000 pro Zielzelle vorliegen, wobei auch Mengen bis zu 400.000, bis zu 300.000, bis zu 200.000 oder bis zu 100.000 pro Zielzelle induzierbar sind. Ein weiterer bevorzugter Mengenbereich, in dem die Zielantigene vorliegen können, ist von 50.000 bis 100.000 und von 5000 bis 50.000.

Beispiele für induzierbare Oberflächenantigene auf Zielzellen (Zielantigene), die für eine Immuntherapie durch intakte bispezifische und trispezifische Antikörper einsetzbar sind, sind Hitzeschock-Proteine und "MHC-Klasse I-verwandte" MIC-Moleküle. Hitzeschock-Proteine (Hsp) werden von der Zelle als Antwort auf Zellstreß synthetisiert. Unter "Zellstreß" ist erfindungsgemäß beispielsweise eine Entartung der Zelle, das Einwirken von Strahlen, chemischen Substanzen und von erhöhter Temperatur auf die Zelle sowie die Infektion der Zelle durch Mikroorganismen zu subsumieren. Zur Zeit sind vier Familien von Hitzeschock-Proteinen bekannt, die aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts differenziert werden. Diese Familien werden als Hsp25, Hsp60, Hsp70 und Hsp90 bezeichnet, wobei die Zahl das ungefähre Molekulargewicht der Streßproteine in Kilo-Dalton wiedergibt. Die Hitzeschock-Proteine zeichnen sich durch hochkonservierte Aminosäuresequenzen aus, wobei der Grad der Konservierung bei über 35 % Aminosäure-Identität, bevorzugt bei 35 - 55 %, weiterhin bevorzugt 55 - 75% und am bevorzugtesten zwischen 75 % bis 85 % Aminosäure-Identität liegt.

Auf folgende Übersichtsartikel wird verwiesen: Annu. Rev. Genet. 27, 437-496 (1993); Biochimie 76, 737-747 (1994); Cell. Mol. Life Sci. 53, 80-129, 168-211 (1997); Experientia 48, 621-656 (1992); Kabakov u. Gabai, Heat Shock Proteins and Cytoprotection, Berlin: Springer 1997.

Hitzeschock-Proteine werden im Normalfall auf gesundem Geweb nicht exprimiert. Es gibt jedoch Untersuchungen, die zeigen, daß Hitzeschock-Proteine beispielsweise auf Tumorzellinien und auf Tumormaterial aus Patienten exprimiert werden können (MelWO 00/18435 PCT/EP99/07094

23

cher et al., Nature Medicine, 4:581, 1998). Die Expression der Hitzeschock-Proteine auf den Tumorzellinien ist aber relativ schwach und deshalb für bisher bekannte immuntherapeutische Ansätze mit monoklonalen Antikörpern und unvollständigen (F(ab)2) bispezifischen Antikörpern ungeeignet.

Beispiele für Hitzeschock-Proteine sind Hsp60 und Hsp70/72.

Gleiches gilt für MIC-Moleküle. Auch diese Moleküle sind durch Zellstreß, wie oben näher definiert, induzierbar. MIC-Moleküle sind MHC I-verwandte Moleküle, die unter Kontrolle von Hitzeschock-Promoter-Elementen stehen (Groh et al., PNAS 93: 12445, 1996). Beispiele für MIC-Moleküle sind MIC A und MIC B. Auch für MIC-Moleküle konnte gezeigt werden, daß sie auf Normalgewebe nicht oder nur in so geringer Menge exprimiert werden, daß sie als Zielstruktur zur Erkennung durch einen Antikörper, um eine Zerstörung der Zielzelle zu erreichen, nicht geeignet sind, während sie auf beispielsweise epithelialen Tumoren in einer solchen Menge exprimiert werden, daß sie durch die erfindungsgemäß bereitgestellten bispezifischen und trispezifischen Antikörper bei einer Immuntherapie als Zielantigene einsetzbar sind.

Die erfindungsgemäß bereitgestellten intakten bispezifischen oder trispezifischen Antikörper werden so ausgewählt, daß sie gegen zumindest ein Zielantigen auf einer Zielzelle gerichtet sind, welches induzierbar ist und auf der Zielzelle im nicht induzierten Zustand nicht oder im wesentlichen nicht vorkommt. Diese Zahl liegt beispielsweise bei ca. 100 Zielantigenen/Zelle. Dies heißt jedoch nicht, daß derartige Zielantigene auf anderen Zellen, d.h. Nicht-Zielzellen, nicht vorkommen können. Beispielsweise kommen auf sich schnell regenerierendem Gewebe, z.B. den Schleimhautzellen des Magen-Darm-Traktes, auch im physiologischen Zustand, konstitutiv exprimiert, Hitzeschockproteine vor. Diese Hitzeschockproteine werden jedoch von der vorliegenden Erfindung nicht mit umfaßt, da sie nicht induzierbar

sind, sondern bereits auf Normalgewebe vorkommen. Bei Verwendung der erfindungsgemäßen Antikörper, die gegen Hitzeschockproteine gerichtet sind, können auch bestimmte Schleimhautzellen des Magen-Darm-Traktes zerstört werden, da diese, wie oben ausgeführt, konstitutiv Hitzeschockproteine auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Die mögliche Zerstörung dieser Zellen ist für einen Patienten zwar mit gewissen Nachteilen verbunden, die jedoch im Vergleich zur erzielbaren Tumorzerstörung gering anzusetzen sind.

Das sich schnell regenerierende Gewebe ist somit nicht primäres Target der erfindungsgemäßen Antikörper, kann jedoch dann von den Antikörpern "getroffen" werden, wenn der erfindungsgemäße Antikörper nicht nur die induzierbaren Zielantigene auf der Zielzelle erkennt, sondern diese Antigene z.B. auch auf sich schnell regenerierendem Gewebe vorkommen. Da sich dieses Gewebe jedoch schnell teilt, kann nach Absetzen der Antikörper-Therapie der ursprüngliche Zustand dieses Gewebes relativ rasch so wieder hergestellt werden, daß es seine physiologische Aufgabe wieder erfüllen kann. Die Erfindung ist also nicht darauf gerichtet, daß die erfindungsgemäßen bispezifischen und trispezifischen Antikörper Antigene auf z.B. sich schnell regenerierendem Gewebe erkennen, welche dort unter Umständen konstitutiv exprimiert werden, sondern die Erfindung umfaßt ausschließlich solche Antikörper, die gegen Zielantigene gerichtet sind, die auf der Zielzelle induzierbar sind und nach Induktion, beispielsweise auch konstitutiv, exprimierbar sind.

Erfindungsgemäß werden unter "induzierbar" solche Zielantigene verstanden, die hier operationell tumorspezifisch sind und im physiologischen Zustand auf der Zelle nicht oder nur in einer solchen Anzahl vorkommen, daß eine Immunantwort gegen sie nicht induzierbar ist oder eine Zerstörung der Zielzellen aufgrund dieser geringen Anzahl nicht oder in einem nicht wesentlichen, therapeutisch nutzbaren Umfang stattfindet.

Als induzierbare Zielantigene auf einer Zielzelle sind nicht

WO 00/18435 PCT/EP99/07094

25

nur solche auf einer Tumorzelle zu verstehen, sondern auch Antigene, die induziert werden, wenn die Zielzelle beispielsweise durch einen Mikrooganismus infiziert wird. Unter "Mikroorganismus" wird erfindungsgemäß jeder Organismus verstanden, der die Zielzelle so beeinflußt, daß auf seiner Oberfläche ein vom Mikroorganismus induziertes Zielantigen im oben beschriebenen Umfang exprimiert wird. Unter Mikroorganismen werden erfindungsgemäß beispielsweise Bakterien, Viren, Protozoen und Pilze verstanden. Zu den Bakterien gehören beispielsweise Gram-positive und und Gram-negative Bakterien, Mycoplasmen und Rickettsien. Von den Protozoen mitumfaßt werden insbesondere Plasmodien. Von den Viren umfaßt werden beispielsweise Retroviren, Adenoviren, Herpesviren, Hepatitis-Viren, Togaviren, Pockenviren usw. Entscheidend ist, daß in Zellen, die von einem oder mehreren dieser Mikroorganismen infiziert wurden, auf der Zelloberfläche Antigene exprimiert werden, die durch die Mikroorganismen-Infektion induziert werden. Dabei handelt es sich um Antigene, die von den Zielzellen als Antwort auf die Mikroorganismen-Infektion produziert werden und auf der Zelloberfläche erscheinen (wirtseigene Antigene), nicht dagegen um Zielantigene, die durch die Mikroorganismen selbst produziert werden. Die Infektion einer Zielzelle durch einen Mikroorganismus führt ebenfalls zu einer Zellstreß-Situation für die Zelle, die als Antwort hierauf die Expression bestimmter Proteine induziert, beispielsweise von Hitzeschock-Proteinen und von MIC-Proteinen.

Die erfindungsgemäß bereitgestellten intakten bispezifischen und trispezifischen Antikörper führen nicht nur einen Typ von Immunzellen, sondern T-Zellen und akzessorische Zellen an die Zielzelle heran, und sie sind aus diesem Grund für die Erkennung induzierbarer Oberflächenantigene als operationelle Zielstrukturen besonders geeignet. Es konnte gezeigt werden, daß bereits wenige Zielantigene in einer Menge von 100 bis 5000 pro Zelle auf der Zielzelle ausreichend sind, um diese zu zerstören. Die hierzu durchgeführten in vitro-Experimente mit Stammzellpräparaten (PBSZ) sind im nachfolgenden Beispiel A beschrieben. Somit ist die erfindungsgemäße Klasse intakter bi-

spezifischer und trispezifischer Antikörper befähigt, auch bei einer sehr geringen Expression der Zielantigene Tumorzellen oder Zielzellen zu zerstören oder nach deren Erkennung eine Immunantwort zu initiieren.

Die erfindungsgemäßen Antikörper können, da sie gegen induzier-

bare Antigene gerichtet sind, dazu beitragen, das Problem fehlender zielzellspezifischer, für eine Immuntherapie notwendige Zielantigene auf Tumorzellen und auf durch Mikroorganismen infizierten Zellen zu lösen. Da derartige induzierbare Antigene nicht nur auf Tumorzellen vorkommen, sondern generell in Streßsituationen produziert werden, können auch Erkrankungen immuntherapeutisch angegangen werden, die durch Infektion von beispielsweise Viren, Einzellern, Bakterien oder Pilzen ausgelöst wurden. Hierbei handelt es sich um die oben bereits näher beschriebenen MIC-Moleküle und Hitzeschock-Proteine.

#### BEISPIEL 1

Nachdem in präklinischen Tiermodellen die herausrangende Wirksamkeit von intakten bsAk nicht nur in vitro, sondern auch in vivo belegt werden konnte (Lindhofer et al., Blood, 88:4651, 1996), wurde die Reinigung von Stammzellpräparaten von kontaminierenden Tumorzellen als weitere Anwendungsmöglichkeit entwikkelt (Lindhofer et al., Exp. Hematol. 25:879, 1997).

Auf diesen Versuchen aufbauend, konnte in Folgeversuchen mit kompletten Stammzellpräparaten (ca. 2 x 10e10 Zellen), insbesondere die Wirksamkeit im untergesättigten Bereich der Zielantigene nachgewiesen werden. D.h. es wurde, in Titrationsversuchen, so wenig intakter bsAk verabreicht, daß in einem PBSZ (Periphere Blut-Stammzellen)-Präparat mit ca. 6,5 x 10e9 T-Zellen, bei einer Gabe von 5µg Antiköper/Präparat, lediglich 3000 CD3 Moleküle von ca. 30.000 CD3 Molekülen/T-Zelle mit dem bsAk gebunden vorlagen (siehe Berechnung). Trotzdem waren die intak-

WO 00/18435 PCT/EP99/07094

27

ten bsAk in der Lage, auch unter diesen Bedingungen, die Zielzellen (hier Tumorzelle: HCT-8) zu zerstören.

Die Versuche waren so aufgebaut, daß von derartig behandelten PBSZ-Präparaten Aliquots entnommen und mit einer definierten Menge von Tumorzellen kontaminiert wurden. Es konnte gezeigt werden, daß die Tumorzellen selbst bei dieser geringen Konzentration von intakten bsAk, bei der nur ein Teil der Zielantigene besetzt vorliegen, zerstört werden.

Die Auswertung des oben beschriebenen Experiments führte zu folgenden Ergebnissen:

Patient	Patient WaGr Gesamtzellzahl PBSZ: 2,5 x 10 <sup>10</sup> + 5 µg bsAk			
Aliquot	5x10° PBSZ +	bsAk	+ Tumorzellen	
Platte	kein Antikörper	bsAk anti- CD3Xepcam	Tumorzellen/mononukleäre Zellen (PBSZ)/Loch	
24er	6/6*	0/6°	2x10 <sup>4</sup> / 2x10 <sup>6</sup>	
96er	12/12	0/12	5000 / 5 x 10 <sup>5</sup>	
Tumor- reduktion: keine		>5log	Tumorzellanteil: 1% °Σ=1,2x10 <sup>5</sup> Tumorz./6- Löcher	

<sup>\*</sup> Anzahl der Löcher mit Tumorwachstum, von 6 bzw. 12 plattierten Löchern, nach 14 Tagen Kultivierung.

Titrationsversuche mit der Tumorzellinie HCT-8 haben ergeben, daß bereits 1-2 Tumorzellen/Loch ausreichen, um nach 14 Tagen Kultivierung ein deutliches visuell auswertbares Tumorwachstum in 95% aller plattierten Löcher darzustellen.

## Berechnung:

Ein intakter bsAk hat ein Molekulargewicht von 150 KDa. D.h. 1 Mol sind 150 Kg und entsprechen definitionsgemäß  $6 \times 10^{23}$  Molekülen. Damit entsprechen 5 µg ca.  $2 \times 10^{13}$  Molekülen.

Nachdem in einem Stammzellpräparat  $6,5 \times 10^9$  T-Zellen bestimmt wurden und eine T-Zelle ca. 30.000 CD3 Moleküle trägt, kommt man auf eine Gesamtzahl von  $19,5 \times 10^{13}$  CD3 Molekülen im Stamm-

# zellpräparat.

Da jeder bsAk einen anti-CD3 Bindungsarm besitzt, kann gefolgert werden, daß theoretisch, setzt man die beiden oben berechneten Molekülmengen in Bezug, in diesem konkreten Beispiel nicht mehr als ca. 3000 CD3 Moleküle von den bsAk besetzt werden können.

## LITERATUR

- 1. Haagen et al., Interaction of human moncyte Fcy receptors with rat IgG2b, J. Immunolog., 1995, 154: 1852-1860
- 2. Gast G.C., Haagen I.-A., van Houten A.A., Klein S., Duits A.J., de Weger R.A., Vroom T.M., Clark M.R., J. Phillips, van Dijk A.J.G., de Lau W.B.M., Bast B.J.E.G. CD8 T-cell activation after intravenous administration of CD3 X CD19 bispecific antibody in patients with non-Hodgkin lymphoma. Cancer Immunol. Immunother. 40: 390, 1995
- 3. Tenny, C., Jacobs, S., Stoller, R., Earle, M., and Kirk-wood, J. Adoptive cellualr immunotherapy with high-dose chemotherapy and autologous bone marrow rescue (ABMR) for recurrent breast cancer (meeting abstract).
  Proc.Annu.Meet.Am.Soc.Clin.Oncol; 11: A88, 1992 ISSN: 0736-7589. CO: PMAODO 7589 CO, 1993.
- 4. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy - 133 randomised trials involving 31 000 recurrences and 24 000 deaths among 75 000 women. Part II Lancet 339: 71-85, 1992
- 5. Guo et al., Effective tumor vaccines generated by in vitro modification ot tumor cells with cytokines and bispecific monoclonal antibodies. Nature Medicine 3: 451, 1997
- 6. Lindhofer et al., Preferential species-restricted heavy-light chain pairing in rat-mouse quadromas: Implications for a single step purification of bispecific antibodies,

  J. Immunology 1995, 155:219

Verwendung von Tumorzellen zeitversetzt in Kombination mit intakten Antikörpern zur Immunisierung

### **PATENTANSPRÜCHE**

- 1. Verwendung autologer Tumorzellen oder allogener Tumorzellen desselben Tumortyps, die je so behandelt wurden, daß ihr Überleben nach Reinfusion verhindert wird, in zeitlich abgestufter Anwendung mit intakten bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörpern mit den nachfolgenden Eigenschaften:
  - α) Binden an eine T-Zelle;
  - B) Binden an zumindest ein Antigen auf einer Tumorzelle;
  - γ) Binden durch ihren Fc-Teil (bei bispezifischen Antikörpern) oder durch eine dritte Spezifität (bei tri-

spezifischen Antikörpern) an Fc-Rezeptor positiven Zellen,

wobei dem zu immunisierenden Menschen oder dem zu immunisierenden Tier die Tumorzellen und die gegen die Tumorzellen gerichteten intakten Antikörper zeitversetzt verabreicht werden, um eine Immunisierung gegen den Tumor zu erzielen.

- Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen vor den Antikörpern oder die Antikörper vor den Tumorzellen verabreicht werden, wobei der Zeitraum zwischen der jeweiligen Verabreichung 1 - 48 Stunden beträgt.
- 3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Zeitraum 1 - 24 Stunden, bevorzugt 1 - 12 Stunden, weiterhin bevorzugt 1 - 6 Stunden oder 1 - 4 Stunden oder 2 - 4 Stunden beträgt.
- 4. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper in einer Menge, je bezogen auf eine Infusion, von 5 500 μg, bevorzugt 10 300 μg, weiterhin bevorzugt 10 100 μg oder 10 50 μg, und die Tumorzellen in einer Menge, bezogen auf eine Infusion, von 10<sup>7</sup> 10<sup>9</sup> Zellen, bevorzugt ca. 10<sup>8</sup> Zellen, verabreicht werden.
- Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Antikörper so ausgewählt werden, daß sie über ihren Fc-Teil bei bispezifischen Antikörpern oder über ihren spezifischen Bindungsarm bei trispezifischen Antikörpern

9.

zur Bindung Fc-Rezeptor positiver Zellen befähigt sind, die einen Fcy-Rezeptor I, II oder III aufweisen.

- Verwendung nach Anspruch 5,
   dadurch gekennzeichnet,
   daß die Antikörper zur Bindung an Monozyten, Makrophagen,
   dendritische Zellen, "Natural Killer"-Zellen (NK-Zellen)
   und/oder aktivierte neutrophile Zellen als Fcγ-Rezeptor I
   + III positive Zellen befähigt sind.
- 7. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
  dadurch gekennzeichnet,
  daß die Antikörper zur Induktion von tumorreaktiven Komplement-bindenden Antikörpern und damit zur Induktion einer humoralen Immunantwort befähigt sind.
- 8. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper so ausgewählt werden, daß sie über CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD28 und/oder CD44 an die T-Zellen binden.
- sprüche,
  dadurch gekennzeichnet,
  daß die Antikörper so ausgewählt werden, daß nach ihrer
  Bindung an die Fc-Rezeptor positiven Zellen die Expression
  von CD40, CD80, CD86, ICAM-1 und/oder LFA-3 als kostimulatorische Antigene und/oder die Sekretion von Zytokinen
  durch die Fc-Rezeptor positive Zelle initiiert oder erhöht
  wird.

Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden An-

10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper so ausgewählt werden, daß die Sekretion von IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, INF- $\gamma$  als Zytokine und/oder von TNF- $\alpha$  erhöht wird.

11. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß der bispezifische Antikörper so ausgewählt wird, daß
er ein anti-CD3 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD4 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder
anti-CD5 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder antiCD6 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD8 X
anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD2 X antiTumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD28 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-Tumorassoziiertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-Tumorassoziiertes Antigen- und/oder ist.

 Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,

daß der bispezifische Antikörper aus einer oder mehreren der nachfolgenden Isotykombinationen ausgewählt wird:

Ratte-IgG2b/Maus-IgG2a, Ratte-IgG2b/Maus-IgG2b, Ratte-IgG2b/Maus-IgG3,

Ratte-IgG2b/Human-IgG1,
Ratte-IgG2b/Human-IgG2,
Ratte-IgG2b/Human-IgG3[orientaler Allotyp G3m(st) = Bindung an Protein A],
Ratte-IgG2b/Human-IgG4.

Ratte-IgG2b/Ratte-IgG2c,

Maus-IgG2a/Human-IgG3[kaukasische Allotypen G3m(b+g) = keine Bindung an Protein A, im folgenden mit \* gekennzeichnet]

WO 00/18435

Maus-IgG2a/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2a/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2a/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale Region von CH2: > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge-CH2-CH3]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG2-[Hinge-CH2-CH3]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG3-[Hinge-CH2-CH3, orientaler Allotyp]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge-CH2-CH3]

Human-IgG1/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-HumanIgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-HumanIgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-HumanIgG2[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-HumanIgG2[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Human-IgG2/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG2-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Human-IgG4/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Human-IgG4/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-HumanIgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]

Maus-IgG2b/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2b/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2b/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-Human-IgG3\*-[CH3] HumanIgG1/Ratte[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-HumanIgG3\*[CH3]

HumanIgG1/Maus[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-Human-IgG3\*[CH3]

Human-IgG4/Human[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-HumanIgG3\*-[CH3]

 Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,

daß der bispezifische Antikörper aus einem heterologen bispezifischen oder trispezifischen Antikörper, bevorzugt einem heterologen Ratte/Maus bispezifischen Antikörper, ausgewählt wird.

 Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,

daß der trispezifische Antikörper einen T-Zell-Bindungsarm, einen Tumorzell-Bindungsarm und eine dritte Spezifität zur Bindung an Fc-Rezeptor positive Zellen besitzt.

15. Verwendung nach Anspruch 14,

dadurch gekennzeichnet,

daß der trispezifische Antikörper so ausgewählt wird, daß er ein anti-CD3 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/- oder anti-CD4 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD5 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD6 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD8 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD2 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD28 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder ist.

- 21. Verwendung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper gegen solche Zielantigene gerichtet ist, die nach Induktion auf der Zielzelle in einer Anzahl von mindestens 100 und höchstens 500.000 pro Zielzelle vorliegen.
- 22. Verwendung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper weiterhin so ausgewählt wird, daß er zur Aktivierung Fc-Rezeptor positiver Zellen befähigt ist, wodurch die Expression von Cytokinen und/oder co-stimmulatorischen Antigenen initiiert oder erhöht wird.
- 23. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die zeitlich abgestufte Anwendung der intakten bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörper zur Verbesserung des Immunisierungserfolges mehrfach erfolgt.

PCT/EP99/07094

16. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,

WO 00/18435

daß Tumorzellen eingesetzt werden, die durch Bestrahlung, bevorzugt durch γ-Bestrahlung, weiterhin bevorzugt in einer Dosisstärke von 50 bis 200 Gy, oder durch chemische Substanzen, bevorzugt Mitomycin C, behandelt wurden.

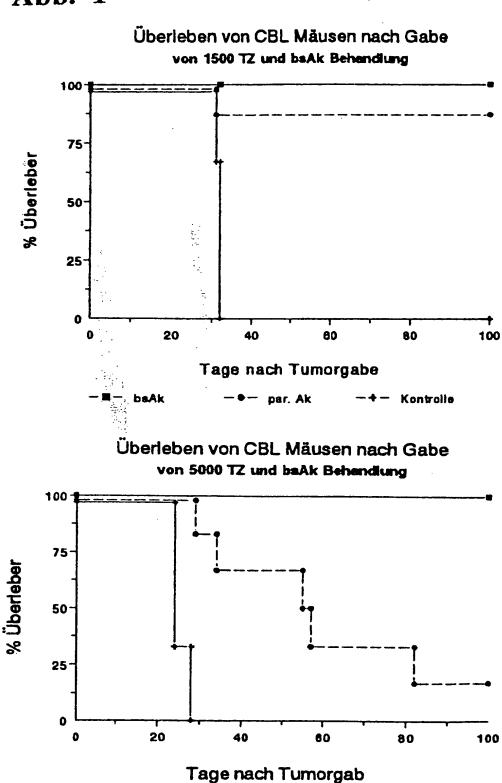
17. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,

daß der Antikörper so ausgewählt ist, daß er an ein Oberflächenantigen als Zielantigen auf der Zielzelle bindet, welches induzierbar ist und im nicht induzierten Zustand (Normalzustand) auf der Zielzelle nicht vorkommt oder in einer derart geringen Zahl, daß die Anzahl für eine Zerstörung der Zielzelle durch den Antikörper nicht ausreicht.

- 18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß zur Steigerung der Immunogenität der Tumorzellen diese vor Verabreichung einer Hitzevorbehandlung unterzogen werden.
- 19. Verwendung nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß als induzierbare Antigene Hitze-Schock-Proteine oder MHC-Klasse-I verwandte MIC-Moleküle eingesetzt werden.
- 20. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß als Hitze-Schock-Proteine HSP25-, HSP60- oder HSP70-(HSP72-) oder HSP90-Proteine und als MIC-Moleküle MIC-A- und MIC-B-Moleküle eingesetzt werden.

Abb. 1

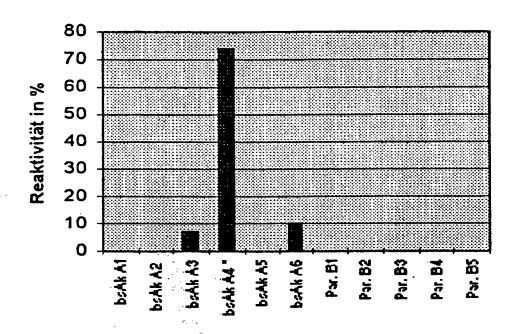


Kontrolle

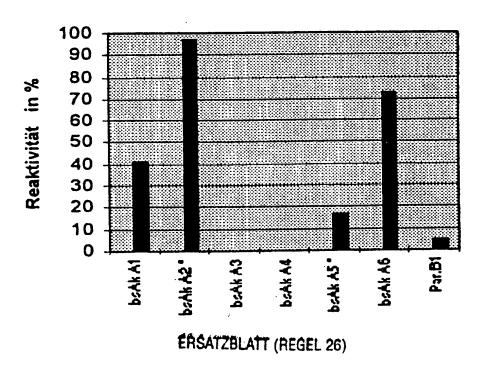
- beAk

Abb. 2

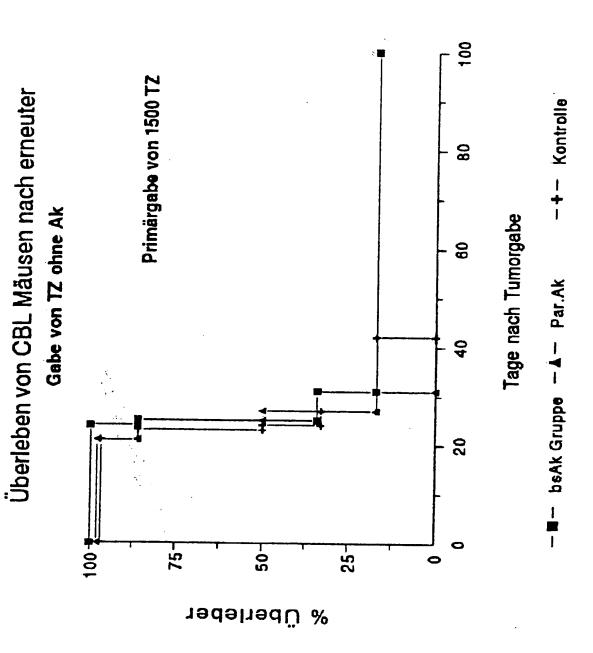
Humorale Antwort nach 1500 TZ

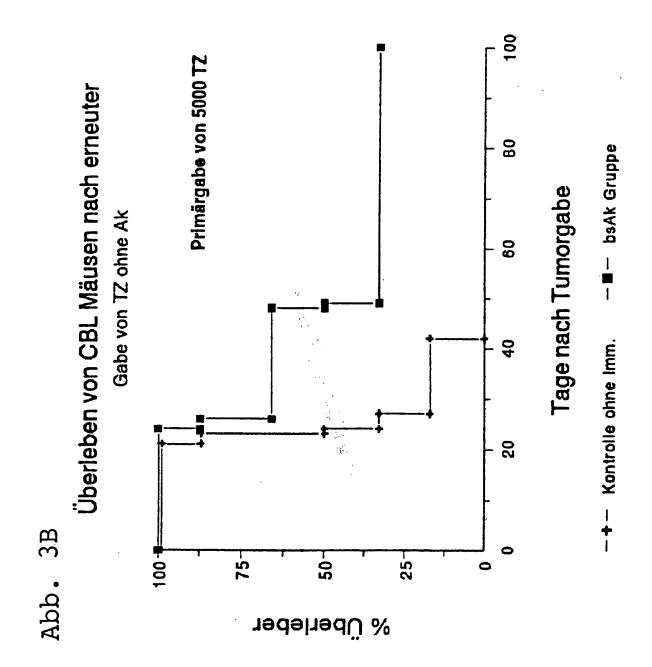


Humorale Antwort nach 5000 TZ



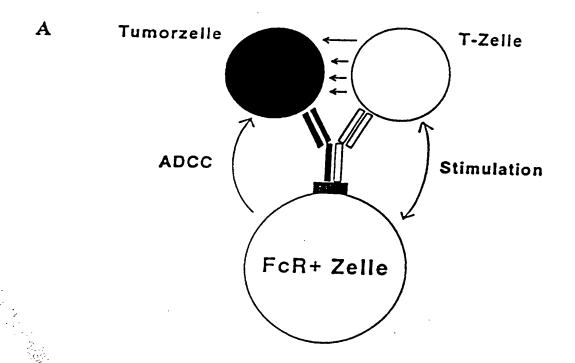


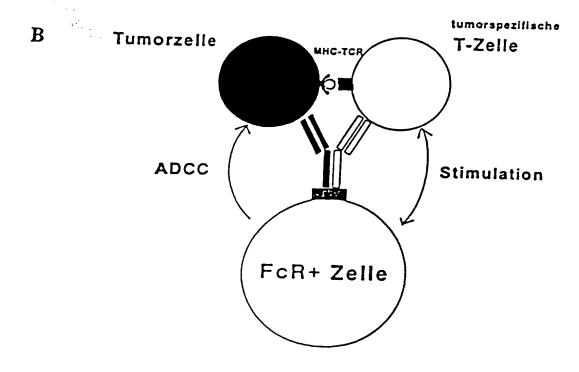




PCT/EP99/07094

Abb.4
Die Rolle von akzessorischen Zellen bei der Tumor-Immuntherapie mittels bispezifischer Antikörper



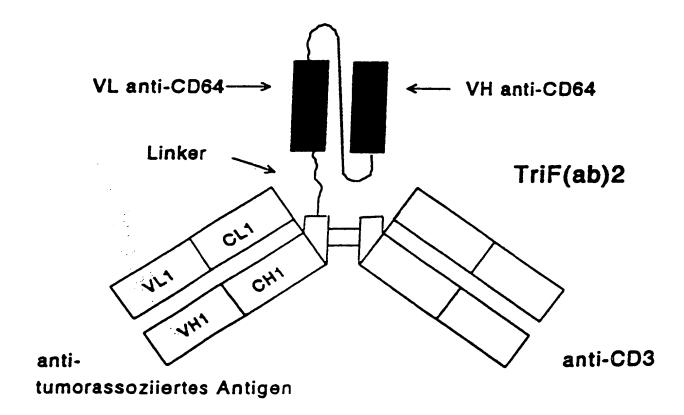


**ERSATZBLATT** (REGEL 26)

THIS PAGE BLAMM (LOSTO)

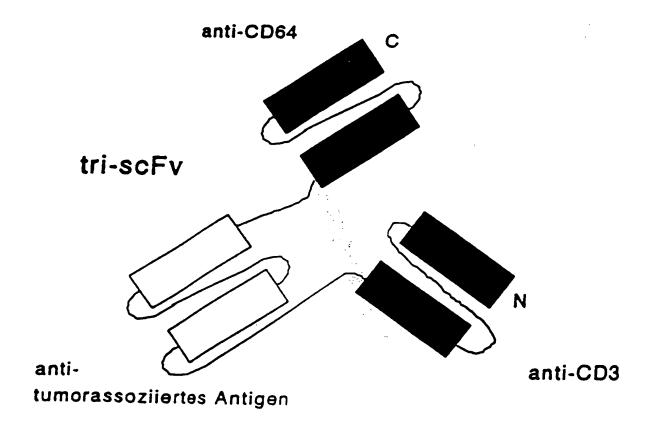
6/8

### ABBILDUNG 5



7/8

## ABBILDUNG 6

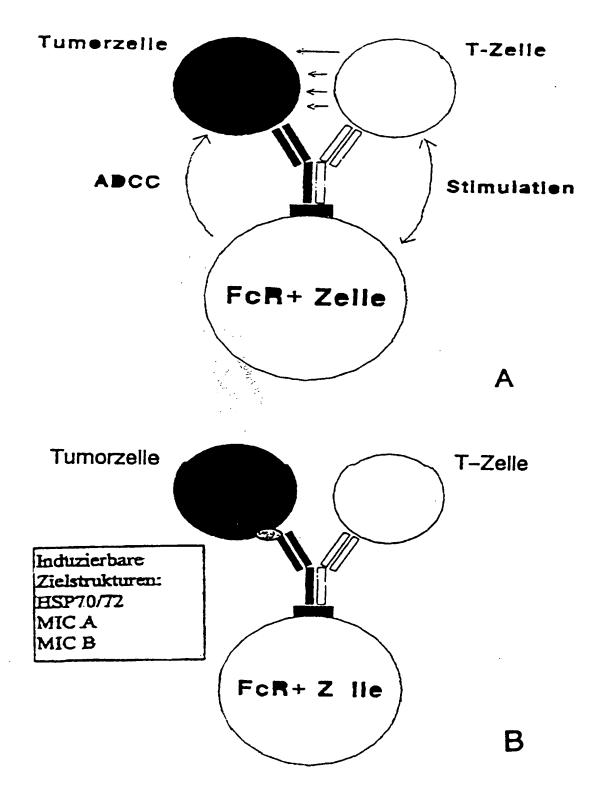


•

.

8/8

Abb. 7 A + B



A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER 1PC 7 A61K39/395 A61K35/14 //C07K16/42,C07K16/28,C07K16/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

#### B. FIELDS SEARCHED

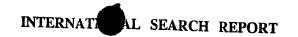
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC  $\frac{7}{1000}$  CO7K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

X LINDHOFER H ET AL: "BISPECIFIC ANTIBODIES TARGET OPERATIONALLY TUMOR-SPECIFIC ANTIGENS IN TWO LEUKEMIA RELAPSE MODELS" BLOOD, US, PHILADELPHIA, PA, vol. 88, no. 12, 15 December 1996 (1996-12-15), pages 4651-4658, XP000616201 ISSN: 0006-4971 abstract page 4654, left-hand column, paragraph 2 -page 4655, left-hand column, paragraph 1  Y  -/	C. DOCUM	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
TARGET OPERATIONALLY TUMOR-SPECIFIC ANTIGENS IN TWO LEUKEMIA RELAPSE MODELS" BLOOD, US, PHILADELPHIA, PA, vol. 88, no. 12, 15 December 1996 (1996-12-15), pages 4651-4658, XP000616201 ISSN: 0006-4971 abstract page 4654, left-hand column, paragraph 2 -page 4655, left-hand column, paragraph 1	Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
-/	X	TARGET OPERATIONALLY TUMOR-SPECIFIC ANTIGENS IN TWO LEUKEMIA RELAPSE MODELS" BLOOD,US,PHILADELPHIA, PA, vol. 88, no. 12, 15 December 1996 (1996-12-15), pages 4651-4658, XP000616201 ISSN: 0006-4971 abstract page 4654, left-hand column, paragraph 2	23
	1	-/-	17-22

Further documents are listed in the continuation of box C.	Patent family members are listed in annex.
**Special categories of cited documents:  "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  "E" earlier document but published on or after the international filling date  "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invertion of the considered to involve an invertive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invertion cannot be considered to involve an invertive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invertion cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person sidiled in the art.  "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the International search report
24 February 2000	15/03/2000
Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 851 epo ni, Fax: (+31–70) 340–3016	Covone, M



	·
inter Ap	plication No
PCT/EP 99	/07094

C/Oardina		PCT/EP 99/07094
Category o	ation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Cateflory -	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CAMPBELL F A ET AL: "The role of tumor rejection antigens in host antitumor defense mechanisms."  CANCER, (1995 JUN 1) 75 (11) 2649-55. REF: 88, XP000877103  page 2649, left-hand column, line 21-25  page 2651, left-hand column, line 23-49  page 2652, left-hand column, line 34  -right-hand column, line 40	17-22
X	LINDHOFER H ET AL: "BISPECIFIC ANTIBODIES EFFECTIVELY PURGE CANCER CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD STEM CELL COLLECTIONS WITHOUT AFFECTING COLONY FORMING UNITS" ANNUAL MEETING INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, XX, XX, vol. 25, no. 8, 24 August 1997 (1997-08-24), page 879 XP002048523 the whole document	1,5-16, 23
(	DE 197 10 497 A (GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT) 5 March 1998 (1998-03-05) cited in the application page 2, line 35 -page 3, line 6 page 5, line 25-37 example ALL	1,5-16, 23
, X	EP 0 885 614 A (GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT) 23 December 1998 (1998-12-23) column 3, line 26-37 example 2 claims	1-16,23

Box I	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)				
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:					
1.	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:				
b	Observation: Although Claims 1-23 relate to a method for treatment of the human/animal ody, the search was carried out and was based on the cited effects of the ompound/composition.				
2.	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:				
3.	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).				
Box II	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)				
This Int	ernational Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:				
1.	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.				
2.	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.				
3.	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:				
·					
4.	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:				
Remar	k on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.				
	No protest accompanied the payment of additional search fees.				

information on patent family members

# Inter 21 Application No PCT/EP 99/07094

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date	
DE	19710497	A	05-03-1998	EP JP DE EP JP US	0826696 A 10182487 A 19649223 A 0826695 A 10179151 A 5985276 A	04-03-1998 07-07-1998 05-03-1998 04-03-1998 07-07-1998 16-11-1999
EP	0885614	A	23-12-1998	DE JP	19725586 A 11071288 A	24-12-1998 16-03-1999

KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES PK 7 A61K39/395 A61K35/14 A. KLASS IPK 7 //C07K16/42,C07K16/28,C07K16/30 Nach der Internationalen Patentidassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK **B. RECHERCHIERTE GEBIETE** Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 CO7K Recherchierte aber nicht zum Mindesprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Betr. Anapruch Nr. Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Kategorie® X LINDHOFER H ET AL: "BISPECIFIC ANTIBODIES 1,4-16, TARGET OPERATIONALLY TUMOR-SPECIFIC ANTIGENS IN TWO LEUKEMIA RELAPSE MODELS" BLOOD, US, PHILADELPHIA, PA, Bd. 88, Nr. 12, 15. Dezember 1996 (1996-12-15), Seiten 4651-4658, XP000616201 ISSN: 0006-4971 Zusammenfassung Seite 4654, linke Spalte, Absatz 2 -Seite 4655, linke Spalte, Absatz 1 Y 17-22 Siehe Anhang Patentfamilie Wettere Veröffentlichungen eind der Fortsetzung von Feld C zu | X T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kolliciert, sondern nur zum Verständnis des der \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist Amindang train komment, sorkertt til zum verstande des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "E" älterse Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist Veröffertilichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffertilichung nicht als neu oder auf erfinderlecher Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Le Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zwelfeihaft er-scheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werde Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanepruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Veröffentig gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahellegend ist soil oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffertilichung, die alch auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffertilichung, die vor dem Internationalen Anmeidedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist Absendedetum des Internationalen Recherchenberichts Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche 15/03/2000 24. Februar 2000 Bevolimächtigter Bediensteter Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Petentamt, P.B. 5818 Petentiaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo ni, Fax: (+31–70) 340–3016 Covone, M

5

		PCT/EP 9	9/07094
	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	· <u>* · · · · · · · · · · · · · · · · · · </u>	
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht komm	nenden Telle	Betr. Anspruch Nr.
Y	CAMPBELL F A ET AL: "The role of tumor rejection antigens in host antitumor defense mechanisms." CANCER, (1995 JUN 1) 75 (11) 2649-55. REF: 88 , XP000877103 Seite 2649, linke Spalte, Zeile 21-25 Seite 2651, linke Spalte, Zeile 23-49 Seite 2652, linke Spalte, Zeile 34 -rechte Spalte, Zeile 40		17-22
X	LINDHOFER H ET AL: "BISPECIFIC ANTIBODIES EFFECTIVELY PURGE CANCER CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD STEM CELL COLLECTIONS WITHOUT AFFECTING COLONY FORMING UNITS" ANNUAL MEETING INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, XX, XX, Bd. 25, Nr. 8, 24. August 1997 (1997-08-24), Seite 879 XP002048523 das ganze Dokument		1,5-16, 23
x	DE 197 10 497 A (GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT) 5. März 1998 (1998-03-05) in der Anmeldung erwähnt Seite 2, Zeile 35 -Seite 3, Zeile 6 Seite 5, Zeile 25-37 Beispiel ALL		1,5-16, 23
P,X	EP 0 885 614 A (GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT) 23. Dezember 1998 (1998-12-23) Spalte 3, Zeile 26-37 Beispiel 2 Ansprüche		1-16,23
		i	



### INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In...nationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07094

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)
Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:
1. X Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 1-23 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
Ansprüche Nr.     well sie sich auf Telle der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine einnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämtich
3. Ansprüche Nr. well es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgetaßt sind.
Feld II Bemerkungen bei mangeinder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)
Die internationale Recherchenbehörde hat feetgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Enfindungen enthält:
Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchlerbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erfordertichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenden der Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen ertaßt:
Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs  Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ahne Widerspruch.

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur seiben Patentfamilie gehören

Inten (	s Aktenzeichen
PCT/EP	99/07094

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung	
DE 19710	497	A	05-03-1998	EP JP DE EP JP US	0826696 A 10182487 A 19649223 A 0826695 A 10179151 A 5985276 A	04-03-1998 07-07-1998 05-03-1998 04-03-1998 07-07-1998 16-11-1999
EP 08856	14	Α	23-12-1998	DE JP	19725586 A 11071288 A	24-12-1998 16-03-1999



### PATENT COOPERATION TREATY

# **PCT**

### INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's on agent's file reference		C New C	and a first of International	
Applicant's or agent's file reference P11655 Dr.B/La	FOR FURTHER ACTION		cation of Transmittal of International Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No.	International filing date (day)		Priority date (day/month/year)	
PCT/EP99/07094	22 September 1999 (2	22.09.99)	25 September 1998 (25.09.98)	
International Patent Classification (IPC) or na A61K 39/395, 35/14, C07K 16/4			·	
Applicant	LINDHOFER, H	lorst		
This international preliminary example Authority and is transmitted to the appropriate to the appropria	mination report has been pre pplicant according to Article 3	pared by this 6.	International Preliminary Examining	
2. This REPORT consists of a total of	6 sheets, includ	ing this cover s	sheet.	
been amended and are the ba	nied by ANNEXES, i.e., sheets asis for this report and/or sheet 607 of the Administrative Inst	s containing re	tion, claims and/or drawings which have ectifications made before this Authority the PCT).	
These annexes consist of a to	otal of sheets.			
3. This report contains indications relat	ting to the following items:			
I Basis of the report				
II Priority				
III Non-establishment	of opinion with regard to nov-	elty, inventive	step and industrial applicability	
IV Lack of unity of in	vention			
V Reasoned statement citations and expla	nt under Article 35(2) with regardations supporting such statem	ard to novelty, nent	inventive step or industrial applicability;	
VI Certain documents	cited	•		
VII Certain defects in t	the international application		<del>-</del>	
VIII Certain observation	ns on the international applicat	ion		
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		···		
Date of submission of the demand	Date	of completion	of this report	
18 April 2000 (18.04.	.00)	07	July 2000 (07.07.2000)	
Name and mailing address of the IPEA/EP	Autho	Authorized officer		
Facsimile No.	Telep	Telephone No.		

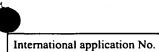
International application No.

### INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

ř

PCT/EP99/07094

I. Basis of the report							
1. This report under Article	has been drawn of	on the basis of (Replace in this report as "origi	cement sheets inally filed"	which have been furnished to the receive and are not annexed to the report since	ing Office in response to an invitation e they do not contain amendments.):		
	the international	application as origin	ally filed.				
	the description,	pagesl-3	30	, as originally filed,			
	_			, filed with the demand,			
		pages		, filed with the letter of	,		
		pages	· ·	, filed with the letter of	· ·		
	the eleime	Nos 1-2	23	, as originally filed,	•		
	the claims,	<u></u>		, as amended under Article 19,			
				, filed with the demand,			
				, filed with the letter of			
				, filed with the letter of			
<u> </u>	the drawings	sheets/6:a 1/	6-6/6	, as originally filed,			
	the drawings,	-		, as originally med, , filed with the demand,	İ		
				, filed with the letter of			
				, filed with the letter of			
2 The amond	monta havo rosult	ed in the cancellation		-,			
2. The amend							
	-	Nos.					
	the drawings,	sheets/fig					
3. This	report has been e	stablished as if (some	e of) the am	endments had not been made, since	they have been considered		
to go	beyond the discl	osure as filed, as indi	icated in the	Supplemental Box (Rule 70.2(c)).			
4. Additional	observations, if n	ecessarv:					
				para da Arra da			
				. •	_		
				-			



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

PCT/EP99/07094

III. Non-establishment of opinion with regard to n velty, inventive step and industrial applicability
The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:
the entire international application.
claims Nos. 1-23 with respect to industrial applicability.
because:
the said international application, or the said claims Nos. 1-23 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):
See separate sheet
the description, claims or drawings (indicate particular elements below) or said claims Nosare so unclear that no meaningful opinion could be formed (specify):
en de la companya de La companya de la co
——————————————————————————————————————
the claims, or said claims Nos are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed.
no international search report has been established for said claims Nos

### INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/EP 99/07094

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

Claims 1-23 relate to subject matter which, in the view of the International Preliminary Examining Authority, falls within the scope of PCT Rule 67.1(iv). Therefore no expert report is established regarding the industrial applicability of the subject matter of these claims (PCT Article 34(4)(a)(i)).

#### INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/EP 99/07094

V.	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
	citations and explanations supporting such statement

Statement			
Novelty (N)	Claims	1-23	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-23	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims		YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

This report makes reference to the following documents:

D1: Blood, 88(12), 1996, 4651-4658

D2: Annual Meeting International Society for Experimental Hematology, 25(8), 1997, page 879

D3: DE-A-197 10 497.

a) Novelty and inventive step

Claim 1 and dependent Claims 2-23 relate to a process for the active immunisation of patients against tumour cells. According to this process, treated tumour cells which are not capable of surviving following reinfusion are injected into the patient; the immunisation effect is strengthened by administering bispecific antibodies whose T cells are directed specifically against the tumour cells. Since the use of bispecific antibodies as well as treated non-viable tumour cells is crucial to this method, the subject matter of Claim 1 differs from that of the X category documents cited in the international search report. Whilst documents D1-D3 relate to the use of bispecific antibodies for combating tumours, none of these documents suggests the reinfusion of treated non-viable tumour cells. In D1 and D3 (see sections cited in the search report) tumor

cells are injected into an animal, but these are not treated cells intended to contribute to an active immunisation, but rather untreated, normally proliferating tumour cells which are injected in order to establish a tumour model and subsequently test the use of bispecific antibodies. Bispecific antibodies are used in D2 to cleanse ex vivo peripheral stem cells used in hematopoietic reconstruction following chemotherapy of contaminated tumour cells; treated non-viable tumour cells are not injected.

Therefore the subject matter of Claim 1 appears to be novel (PCT Article 33(2)). Since none of the documents contains any indication of the use of treated non-viable tumour cells in combination with bispecific antibodies to facilitate an active immunisation, Claim 1 also appears to meet the requirements of PCT Article 33(3).

Dependent Claims 2-23 relate to preferred embodiments of the novel and inventive method from Claim 1, and therefore also meet the requirements of PCT Article 33(2) and 33(3).

#### b) Industrial applicability

The PCT does not contain uniform criteria for assessing the industrial applicability of present Claims 1-23. Patentability may depend on the wording of the claims. The EPO, for example, does not recognise the industrial applicability of claims to the use of a compound in a medical treatment; it does, however, allow claims to the first use of a known compound in a medical treatment or the use of such a compound to manufacture a drug for a new medical treatment.

# MINATION REPORT

### INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/EP 99/07094

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI

EP-A-0 885 614 (D4) was published on 23.12.1998, i.e. after the priority date (25.09.1998) of the present application. This document could therefore only be relevant if the claim to priority proved to be invalid for particular parts of the application. D4 discloses a process for immunisation against tumours which includes the following steps:

- a) isolating autologous tumour cells
- b) treating the tumour cells so as to prevent their survival following reinfusion
- c) incubating the tumour cells thus treated with intact bispecific or trispecific antibodies
- d) reinfusing the antibody-carrying tumour cells.

The antibodies used in D4 are identical with the antibodies according to the present invention.

# PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

		(7 trainer de drid 1 t		- /	<del> </del>
Aktenzeichen des Ar P11655 Dr.B/La	melders oder Anwalts	WEITERES VORGEH		lung über die Übersendung des Prüfungsbericht (Formblatt PC	
		Internationales Anmeldedatu	m/TagMonat/lahr)	Prioritätsdatum (Tag/Monat/T	[ag)
Internationales Akter PCT/EP99/0709		22/09/1999	m(rag/Monavoam)	25/09/1998	ag,
			<u> </u>	23/03/1330	
Internationale Patent A61K39/395	klassification (IPK) oder i	nationale Klassifikation und IPk			
Anmelder					
LINDHOFER, H	orst et al				
Dieser interna     Behörde erste	tionale vorläufige Prü ellt und wird dem Anm	fungsbericht wurde von del elder gemäß Artikel 36 übe	r mit der internatio rmittelt.	onale vorläufigen Prüfung b	eauftragte
2. Dieser BERIC	HT umfaßt insgesam	6 Blätter einschließlich di	eses Deckblatts.		
und/oder Behörde	Zeichnungen, die geä	indert wurden und diesem l chtigungen (siehe Regel 70 nt Blätter.	Bericht zugrunde	itter mit Beschreibungen, A liegen, und/oder Blätter mit tt 607 der Verwaltungsricht	tvordis r
J.3357g5					
		A STATE OF THE STA			
_	t enthält Angaben zu i irundlage des Berichts				
	riorität				
III ⊠ K	eine Erstellung eines	Gutachtens über Neuheit,	erfinderische Täti	gkeit und gewerbliche Anw	endbarkeit
	langeInde Einheitlichk				
V ⊠ E	egründete Feststellur ewerbliche Anwendba	ig nach Artikel 35(2) hinsich arkeit; Unterlagen und Erklä	ntlich der Neuheit irungen zur Stütz	, der erfinderische Tätigkeit ung dieser Feststellung	una der
	estimmte angeführte				
1		internationalen Anmeldung		•••	
VIII DE	Sestimmte Bemerkung	en zur internationalen Anm	eldung	٠.	
Datum der Einreicht	ung des Antrags	Di	atum der Fertigstell	ung dieses Berichts	`
18/04/2000		07	7.07.2000		
Prüfung beauftragte		onalen vorläufigen Be	evollmächtigter Bed	iensteter	STONE DES PAIR TOUR
D-8029	äisches Patentamt 98 München 9 89 2399 - 0 Tx: 52365		on Ballmoos, P		
	19 89 2399 - 4465	ľ	al Nr +49 89 2399	8174	Charles Mich



## INTERNATIONALER VORLÄUFIGER **PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/07094

1.	Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage ( <i>Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach</i> Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.):							
	Beschreibung, Seiten:							
	1-30	)	ursprüngliche Fassung					
	Pate	entansprüche, Nr.	. <del>:</del>					
	1-23	3	ursprüngliche Fassung					
	Zeio	chnungen, Blätter	<b>:</b>					
	1/6-	6/6	ursprüngliche Fassung					
2.	Auf	grund der Änderun	gen sind folgende Unterlagen fortgefallen:					
		Beschreibung,	Seiten:					
		Ansprüche,	Nr.:					
		Zeichnungen,	Blatt:					
3.		angegebenen Gri	ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus d n ünden nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich ssung hinausgehen (Regel 70.2(c)):					
4.	Etw	aige zusātzliche B	demerkungen:					
111.	. Kei	ne Erstellung ein	es Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkei					
Fo	olgen eu, a	nde Teile der Anme uf erfinderischer Ta	oldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als ätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:					
		die gesamte inter	nationale Anmeldung.					
	×	Ansprüche Nr. 1-	23 with respect to industrial applicability.					

Begründung:

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/07094

	⊠	Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 1-23 beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (genaue Angaben):						
		siehe Beiblatt						
		Die Beschreibung, die Ansprück oder die obengenannten Ansprückonnte ( <i>genaue Angaben</i> ):	ne oder die Ze ūche Nr. sind	ichnun so unk	gen ( <i>machen</i> lar, daß kein	Sie hierzu nad sinnvolles Guta	:hstehend gena achten erstellt v	aue Angaben verden
□ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschigestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.							reibung	
		Für die obengenannten Ansprü	che Nr. wurde	e kein i	nternationaleı	· Recherchenbo	ericht erstellt.	
V.	Beg gev	gründete Feststellung nach Art verblichen Anwendbarkeit; Un	tikel 35(2) hin terlagen und	sichtli Erklärt	ch der Neuho ungen zur St	∍it, der erfinde ützung dieser	rischen Tätigl Feststellung	keit und der
1.	Fes	ststellung						
	Ne	uheit (N)	Ja: Anspr Nein: Anspr		1-23 			
	Erfi	inderische Tätigkeit (ET)	Ja: Anspr Nein: Anspr		1-23 			
	Ge	werbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Anspr Nein: Anspr		<u></u>			
2.	Uni	terlagen und Erklärungen						
	sie	he Beiblatt						

### VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

#### Teil III

Die Ansprüche 1-23 beziehen sich auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).

#### Teil V

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1 Blood, 88(12), 1996, 4651-4658
- D2 Annual Meeting International Society for Experimental Hematology, 25(8), 1997, S. 879
- D3 DE-A-197 10 497
- a) Neuheit und erfinderische Tätigkeit

Anspruch 1 und die davon abhängigen Ansprüche 2-23 betreffen ein Verfahren zur aktiven Immunisierung von Patienten gegen Tumorzellen. Dazu werden behandelte Tumorzellen, die nach der Reinfusion in den Patient nicht überleben können, injiziert; der Immunisierungseffekt wird verstärkt, indem bispezifische Antikörper verabreicht werden, welche T-Zellen spezifisch gegen diese Tumorzellen richten. Dadurch, dass sowohl der Einsatz bispezifischer Antikörper als auch behandelter, nicht-überlebensfähiger Tumorzellen für die Methode entscheidend sind, unterscheidet sich der Gegenstand von Anspruch 1 von den im Internationalen Recherchenbericht als X zitierten Dokumenten. Die Dokumente D1-D3 betreffen zwar den Einsatz bispezifischer Antikörper zur Tumorbekämpfung, aber keines dieser Dokumente beinhaltet die Reinfusion behandelter, nicht-überlebensfähiger Tumorzellen. In D1 und D3 (siehe die im Recherchenbericht erwähnten Stellen) werden zwar Tumorzellen in das Tier injiziert, doch handelt es sich nicht um behandelte Zellen, die zu einer aktiven Immunisierung beitragen sollen, sondern es werden unbehandelte, normal proliferierende Tumorzellen injiziert, um ein Tumormodell zu etablieren und danach den Einsatz bispezifischer Antikörper zu testen. In D2 werden die

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT

bispezifischen Antikörper verwendet, um periphere Blutstammzellen, welche zur hämatopoietischen Rekonstitution nach Chemotherapie verwendet werden, von kontaminierenden Tumorzellen ex vivo zu reinigen; behandelte, nicht-lebensfähige Tumorzellen werden nicht injiziert.

Der Gegendstand des Anspruchs 1 scheint deshalb neu zu sein (Art. 33(2) PCT). Da keines der Dokumente einen Hinweis enthält auf die Verwendung behandelter nichtlebensfähiger Tumorzellen in Kombination mit bispezifischen Antikörpern um eine aktive Immunisierung zu ermöglichen, scheint Anspruch 1 auch die Erfordernisse des Art. 33(3) PCT zu erfüllen.

Die abhängigen Ansprüche 2-23 betreffen bevorzugte Ausführungsformen der neuen und erfinderischen Methode aus Anspruch 1 und genügen somit auch den Erfordernissen der Art. 33(2) und (3) PCT.

#### b) Gewerbliche Anwendbarkeit

Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 1-23 gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

#### Teil VI

EP-A-0 885 614 (D4) ist am 23.12.1998 und somit nach dem Prioritätsdatum (25.09.1998) veröffentlicht worden. Dieses Dokument könnte deshalb nur relevant werden, falls der Prioritätsanspruch sich als für gewisse Teile der Anmeldung nicht gültig erweisen würde. D4 offenbart ein Verfahren zur Immunisierung gegen Tumoren, das folgende Schritte umfasst:

a) Isolierung autologer Tumorzellen

がない。



# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/07094

- b) Behandeln der Tumorzellen, um ihr Überleben nach Reinfusion zu verhindern
- c) Inkubation der so behandelten Tumorzellen mit intakten bi- oder trispezifischen Antikörpern
- d) Reinfusion der mit den Antikörpern beladenen Tumorzellen.

Die in D4 verwendeten Antikörper sind identisch mit den erfindungsgemässen Antikörpern.